

ETUDE DE L'INTERACTION
ENTRE LE TAUROCHOLATE DE SODIUM
ET DEUX DERIVES SALICYLES;
INCIDENCE SUR LES PHENOMENES DE TRANSPORT

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences pharmaceutiques

par

Chantal GARCIN-SALOMON

—
de

LANCY (Genève)

Thèse No 1898

1979

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1979

UNIVERSITE DE GENEVE
Section de pharmacie
Pharmacie galénique

FACULTE DES SCIENCES
Professeur P. BURI

**ETUDE DE L'INTERACTION
ENTRE LE TAUROCHOLATE DE SODIUM
ET DEUX DERIVES SALICYLES;
INCIDENCE SUR LES PHENOMENES DE TRANSPORT**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences pharmaceutiques

par

Chantal GARCIN-SALOMON

de

LANCY (Genève)

Thèse No 1898

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1979

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs P. Buri, professeur ordinaire et directeur de thèse, E. Doelker, professeur assistant (Section de Pharmacie — Genève) et F. Puisieux, professeur (Université de Paris-Sud — Châtelay-Malabry), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 1er décembre 1978

Le doyen :
Bernard Levrat

Thèse No 1898



Que le professeur P. Buri trouve ici toute l'expression de ma sincère reconnaissance pour l'intérêt et les encouragements qu'il a témoignés à ce travail entrepris sous sa direction.

J'adresse tous mes remerciements aux professeurs F. Puisieux et E. Doelker qui ont accepté d'être membres du jury, ainsi qu'au professeur J.M.J. Tronchet, président de la Section de Pharmacie, qui a bien voulu présenter cette thèse à la Faculté des Sciences.

Je tiens également à exprimer ma plus vive gratitude au docteur C. Crevoisier pour ses nombreux conseils et son intérêt tout au long de ce travail, au docteur J.J. Schaer pour son assistance dans la partie physico-chimique, au docteur R. Gurny pour l'élaboration des programmes d'ordinateur, à Mademoiselle J. Boucherat pour sa collaboration technique.

Je remercie tous mes collègues du laboratoire de pharmacie galénique pour leur soutien et tout particulièrement Madame J. Blanc pour la dactylographie du texte et Monsieur J.-P. Vuagniaux pour la réalisation des schémas.

A MES PARENTS

ET A PASCAL

TABLE DES MATIERES

Avant-propos	p.	1
I.	Propriétés des tensio-actifs	3
I.1	Influence des tensio-actifs sur les phénomènes de transport	3
I.2	Concentration micellaire critique (C.M.C.)	4
I.2.1	Signification de la C.M.C. et formation des micelles	4
I.2.2	Méthodes de détermination de la C.M.C.	6
II.	Choix et propriétés des produits utilisés	8
II.1	Milieux	8
II.2	Taurocholate de sodium	8
II.2.1	Structure chimique et propriétés	8
II.2.2	Détermination expérimentale de la C.M.C. du TCNa	10

II.2.2.1	Méthodes utilisées	p. 10
II.2.2.2	Résultats et commentaires	11
II.3	Principes actifs	17
III.	Etude <i>in vitro</i> des interactions TCNa - principes actifs	19
III.1	Phénomène de solubilisation micellaire	19
III.1.1	Définition et importance	19
III.1.2	Méthodes d'étude	20
III.1.3	Description mathématique du phénomène	20
III.1.4	Revue de la littérature	25
III.2	Méthode de la solubilité	30
III.2.1	Rappel théorique	30
III.2.2	Mode opératoire	32
III.2.3	Résultats et commentaires	33
III.3	Méthode de la dialyse à l'équilibre	40
III.3.1	Rappel théorique	40
III.3.2	Mode opératoire	43
III.3.3	Résultats et commentaires	44
III.4	Méthode de la dialyse dynamique	54

III.4.1	Rappel théorique	p. 54
III.4.2	Mode opératoire	58
III.4.3	Résultats et commentaires	60
III.4.4	Analyse des résultats par régression multiple	66
III.5	Conclusions de l'étude <i>in vitro</i>	71
IV.	Influence du TCNa sur l'absorption des principes actifs chez le rat	76
IV.1	Absorption de substances médicamenteuses chez l'animal	77
IV.1.1	Généralités et méthodes d'investigation	77
IV.1.2	Revue de la littérature	78
IV.2	Estimation de l'absorption	83
IV.2.1	Méthode d'évaluation de l'absorption intestinale <i>in situ</i>	83
IV.2.2	Méthode de prélèvements sanguins	84
IV.2.3	Préparation des solutions	85
IV.2.4	Dosages des échantillons	86
IV.2.4.1	Dosage dans le lumen intestinal	86
IV.2.4.2	Dosage dans le sang	87

IV.2.5	Résultats et commentaires	p. 88
IV.2.5.1	Absorption du TCNa	89
IV.2.5.2	Influence du TCNa sur l'absorption des deux dérivés	90
IV.3	Distribution des substances marquées dans différentes parties du système digestif	95
IV.4	Conclusions de l'étude <i>in situ</i>	100
V.	Conclusions générales et résumé	103
	Bibliographie	106

AVANT-PROPOS

Les multiples propriétés des substances tensio-actives leur confèrent un rôle important à différents stades du processus de l'absorption d'un médicament. Ainsi, dans le domaine de la biopharmacie, ils interviennent par exemple comme agents mouillants, solubilisants micellaires, ou modificateurs de la perméabilité membranaire. Chacun de ces effets, isolé ou concomitant, est susceptible de modifier l'intensité de la réponse biologique au travers de la biodisponibilité et de l'absorption.

L'interaction médicament - tensio-actif peut se manifester dans les phénomènes de transport, *in vitro* ou *in vivo*, par la formation d'un système polyphasique entraînant un partage de la substance médicamenteuse entre la phase micellaire et le milieu dispersant. De plus, l'hypothèse d'une action propre des tensio-actifs sur la perméabilité de la membrane elle-même est vérifiée avec certains types de barrières.

Cette recherche se propose d'étudier les interactions entre un tensio-actif physiologique, le taurocholate de sodium, et deux substances médicamenteuses jouant le rôle de traceurs, l'acide salicylique et le salicylamide.

A cet effet, nous recourons à plusieurs méthodes d'investigation *in vitro*, non seulement pour mieux saisir la nature et le mécanisme de ces interactions, mais aussi afin de comparer les informations apportées par chacune des techniques utilisées.

En outre, l'examen du phénomène de transport à l'aide d'un modèle d'étude *in vivo*, permet d'observer les conséquences de cette interaction sur l'absorption des deux substances médicamenteuses. Dans ce cas, plus complexe, le rôle du sel biliaire se manifeste de façon variable, résultant de plusieurs mécanismes; l'effet global peut alors correspondre à un accroissement ou à une diminution du transport.

I. Propriétés des tensio-actifs

Les tensio-actifs sont des composés amphiphiles organiques ou organométalliques qui, en solution, ont la propriété de former, à partir d'une certaine concentration, des associations colloïdales ou *micelles*. Le terme *amphiphile* qualifie des molécules possédant des régions hydrophiles et hydrophobes. Selon la structure chimique de la partie hydrophile, les tensio-actifs se répartissent en tensio-actifs cationiques et anioniques d'une part et non ioniques d'autre part.

I.1 Influence des tensio-actifs sur les phénomènes de transport

Etant donné le très large emploi des substances tensio-actives dans diverses formes médicamenteuses et leur présence dans les milieux biologiques, il est intéressant de connaître les modifications qu'elles peuvent entraîner dans le transport des principes actifs. Un grand nombre d'expériences montre l'activité de ces adjuvants sur la vitesse d'absorption et la réponse pharmacologique de différentes substances¹. Suivant les conditions envisagées, *in vivo*, *in situ* ou *in vitro* ou encore selon la nature du principe actif

ou des tensio-actifs testés, on pourra observer tantôt une diminution, tantôt une augmentation de l'effet mesuré. Dans les expériences *in vivo*, l'effet global résulte de différentes actions, parfois simultanées et de sens opposé². L'efficacité biologique dépend de l'importance de la contribution de différents facteurs³ :

- disponibilité
- solubilisation
- degré de saturation du principe actif
- coefficient de partage
- augmentation de la concentration en principe actif
- effet propre du tensio-actif.

I.2 Concentration micellaire critique (C.M.C.)

I.2.1 Signification de la C.M.C. et formation des micelles

Au-delà d'une certaine concentration, les tensio-actifs forment en solution des agrégats appelés *micelles*. Ces micelles sont monodispersées, sauf dans le cas de solvants non aqueux. Leur taille, très variable, peut aller de dix à vingt monomères à plusieurs milliers. Avec les tensio-actifs ioniques, un travail s'opposant aux forces de répulsion électrostatiques est nécessaire pour permettre le rapprochement des molécules; leurs C.M.C. sont donc plus élevées que celles des composés non ioniques⁴⁻⁶.

La tendance des tensio-actifs à se constituer en micelles résulte de la combinaison de différentes forces contenues dans leurs molécules. On peut les classer et les exprimer selon leur affinité pour divers solvants et selon qu'elles s'opposent ou favorisent la formation de ces agrégats^{7, 8}.

a) Force défavorable :

$$A_{\bar{x}\bar{w}} = A_{\bar{L}\bar{x}\bar{w}} + A_{\bar{H}\bar{x}\bar{w}} \quad (1)$$

b) Forces favorables :

$$A_{\bar{x}\bar{x}} = A_{\bar{L}\bar{x}\bar{x}} + A_{\bar{H}\bar{x}\bar{x}} \quad (2)$$

$$A_{\bar{w}\bar{w}} = A_{\bar{L}\bar{w}\bar{w}} + A_{\bar{H}\bar{w}\bar{w}} \quad (3)$$

Les indices L et H se réfèrent au caractère lipophile ou hydrophile de l'énergie d'interaction A entre le tensio-actif ($\bar{x}$) et l'eau ($\bar{w}$). Les micelles commencent à se former dès que les forces favorables compensent celles qui ne le sont pas. Il est ainsi possible d'expliquer les C.M.C. plus basses des tensio-actifs non ioniques : l'interaction hydrophilique entre l'adjuvant et l'eau, $A_{\bar{H}\bar{x}\bar{w}}$, est faible. D'autre part, un allongement de la chaîne alcoyle produit un abaissement de la C.M.C. par une augmentation de l'interaction $A_{\bar{L}\bar{x}\bar{x}}$, car les forces entre les molécules ou parties de molécules s'accroissent proportionnellement au poids moléculaire du groupement. Ces considérations ont été vérifiées par différents auteurs^{7, 8} qui ont pu, pour

certaines dérivés, établir des formules reliant la valeur de la C.M.C. et la longueur de la chaîne alcoyle.

Cette valeur critique, ou plus exactement cet intervalle de concentrations, est caractéristique de chaque tensio-actif et peut varier selon la nature du milieu, la teneur en sels dissous et la température. Elle coïncide également avec une variation discontinue de plusieurs propriétés physico-chimiques de la solution.

On peut aussi considérer la formation et la présence de ces micelles comme l'apparition d'une nouvelle phase dans le système. Si les micelles sont traitées comme une nouvelle phase, la C.M.C. correspond à l'état de saturation des monomères; un excès de ces derniers conduit à l'apparition de la phase micellaire.

1.2.2 Méthodes de détermination de la C.M.C.

Puisque la présence de micelles influence de nombreuses propriétés physiques, l'observation de leur variation en fonction de la concentration en tensio-actif permet la détermination de la C.M.C.. Parmi les méthodes fréquemment utilisées, citons celles de la tension superficielle, de la conductivité, de la solubilisation d'un colorant, de la diffraction de la lumière^{7,9}.

Les valeurs obtenues par ces différentes techniques ne coïncident pas toujours, en raison notamment du choix du point caractéristique, du type de graphique ou de variables utilisés.

Plusieurs facteurs influencent la C.M.C. :

- type et constitution chimique du tensio-actif
- adjonction de tierces substances
- nature et pH du solvant
- température.

Ainsi, l'adjonction de sels conduit à une diminution de la C.M.C.. L'effet de la température, plus complexe, varie selon le type de tensio-actif; la valeur de la C.M.C. passe par un minimum puis augmente à nouveau.

II. Choix et propriétés des produits utilisés

II.1 Milieux

En vue de discerner l'influence de l'adjonction d'électrolytes et du pH sur les phénomènes étudiés, nous avons choisi trois milieux différents, à savoir :

1) l'eau distillée

2) une solution tampon citratée de pH 2,2

citrate de sodium 0,1 M 330 ml

acide chlorhydrique 0,1 N 670 ml

3) une solution tampon citratée de pH 6,0

citrate de sodium 0,1 M 595 ml

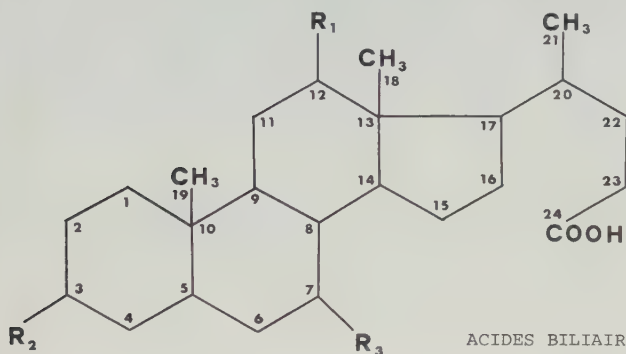
soude caustique 0,1 N 405 ml

II.2 Taurocholate de sodium¹⁰

II.2.1 Structure chimique et propriétés

Les acides biliaires sont des produits finaux du catabolisme du cholestérol. Ces dérivés stéroïdiques portent sur le carbone 17 une chaîne latérale de cinq atomes. La bile humaine renferme les acides cholique (I), chénodésoxycholique (II), désoxycholique (III) et lithocholique (IV). Ils existent

essentiellement sous forme conjuguée avec la taurine et la glycine (entre groupement carboxylique du sel biliaire et amine de la taurine ou de la glycine).



	ACIDES BILIAIRES	R ₁	R ₂	R ₃
I.	Acide cholique	-OH	-OH	-OH
II.	" chénodésoxycholique	-OH	-OH	-H
III.	" désoxycholique	-OH	-H	-OH
IV.	" lithocholique	-OH	-H	-H

Ces acides se trouvent sous forme de sels sodiques au pH de la sécrétion biliaire (6 à 7,5) et sont ainsi solubles dans l'eau; ils possèdent des propriétés tensio-actives.

Dans ce travail, nous avons utilisé le taurocholate de sodium (= TCNa, qualité puriss., pureté minimale de 99%, lot 71204, Koch-Light Lab. Ltd). C'est le sel biliaire le plus fréquemment utilisé dans ce genre d'expérience. Son poids moléculaire est de 537,69 et son pK_a de 1,85¹⁰. Pour les expériences nécessitant le sel biliaire radioactif, nous avons employé du TCNa-¹⁴C, marqué en position 24 et d'une activité spécifique de 51,2 mCi/mmol.

II.2.2 Détermination expérimentale de la C.M.C. du TCNa

La grande variabilité des valeurs rapportées dans la littérature, provenant soit de la qualité des produits, soit de la méthode utilisée, nous a conduit à procéder à la détermination de la C.M.C. de notre échantillon de sel biliaire.

II.2.2.1 Méthodes utilisées

La C.M.C. du TCNa dans les différentes solutions et aux diverses températures étudiées est déterminée par tensiométrie pour tous les milieux et par conductimétrie pour les solutions dans l'eau seule.

La comparaison de deux méthodes permet d'établir une correspondance entre les résultats. Elle justifie l'indication d'un intervalle de préférence à une concentration précise mais souvent arbitraire.

De plus, il existe un certain nombre de facteurs susceptibles de modifier la précision des mesures de tension superficielle, tel que l'intervalle de temps avant ou entre les mesures. Il est donc judicieux de confirmer la validité de cette première méthode par un second procédé.

Tensiométrie

Nous avons adopté la méthode d'arrachement (tensiomètre interfacial de Lecomte du Noüy, anneau de platine, Krüss K 8600). Plusieurs solutions de diverses concentrations en sel biliaire sont préparées et laissées au repos une nuit

au réfrigérateur. La tension superficielle est alors mesurée à trois reprises. La valeur moyenne de chaque solution est portée sur un graphique en fonction du logarithme de la concentration en TCNa.

Conductimétrie

On observe la variation de la conductance des solutions en fonction des diverses concentrations en TCNa (conductimètre avec cellule plongeante Metrohm EA608 de constante $0,79 \text{ cm}^{-1}$). Ensuite, la conductivité molaire est calculée et portée sur un graphique en fonction de la racine carrée de la concentration en tensio-actif.

II.2.2.2 Résultats et commentaires

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans les tableaux 1 et 2. Les représentations graphiques (fig. 1 à 6) permettent de déduire la C.M.C., mentionnée en encadré sur chaque figure.

Dans le but de comparer sur un même graphique les résultats des deux méthodes, les valeurs sont exprimées uniquement en fonction de la racine carrée de la concentration en sel biliaire (fig. 1 à 3).

Tableau 1

Détermination de la tension superficielle et de la conductivité molaire du TCNa dans l'eau, à trois températures différentes
(a = 30°; b = 37°; c = 45°)

Concentration c			Tension superficielle σ	Conductivité molaire Λ
$c/\text{mg}(100 \text{ cm}^3)^{-1}$	$10^3 c/\text{mol dm}^{-3}$	$10^2 (c/\text{mol dm}^{-3})^{1/2}$	$\sigma/\text{mN m}^{-1}$	$\Lambda/\mu\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$
			$\bar{x} \pm s$	
50	0,93	3,05	a) — b) 54,9 + 0,4 c) 54,4 + 0,5	— 105,4 122,0
100	1,86	4,31	a) 50,4 + 0,3 b) 51,3 + 0,8 c) 53,7 + 0,5	95,2 99,8 118,9
150	2,79	5,28	a) — b) 46,8 + 0,4 c) 48,9 + 0,2	94,9 94,9 116,1
200	3,72	6,10	a) 45,1 + 0,6 b) 46,4 + 0,6 c) 47,4 + 0,1	91,3 95,6 114,7
250	4,65	6,82	a) — b) 46,0 + 0,3 c) 44,8 + 0,3	88,8 93,4 112,1
300	5,58	7,47	a) — b) 44,2 + 0,2 c) 44,7 + 0,1	87,8 92,0 110,9
400	7,44	8,63	a) 44,4 + 0,3 b) 44,6 + 0,4 c) 45,2 + 0,1	90,6 93,6 112,0
500	9,30	9,64	a) 45,1 + 0,5 b) 44,4 + 0,1 c) 43,8 + 0,4	75,2 88,4 107,7

Figure 1

Détermination de la C.M.C. du TCNa dans l'eau à 30°

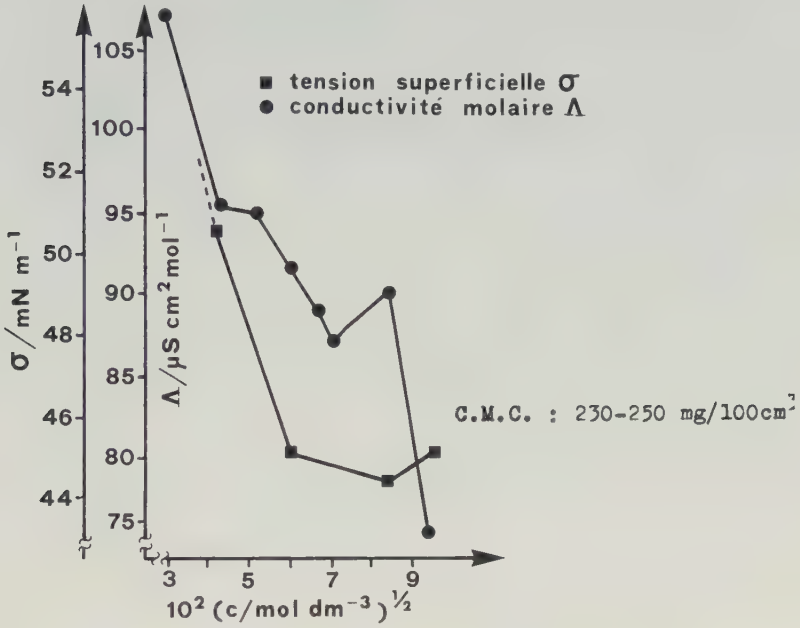


Figure 2

Détermination de la C.M.C. du TCNa dans l'eau à 37°

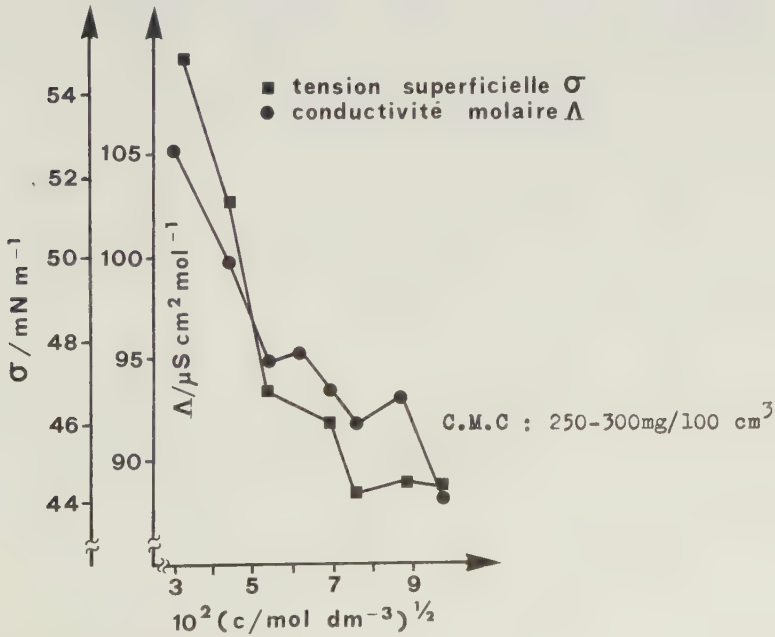


Figure 3

Détermination de la C.M.C. du TCNa dans l'eau à 45°

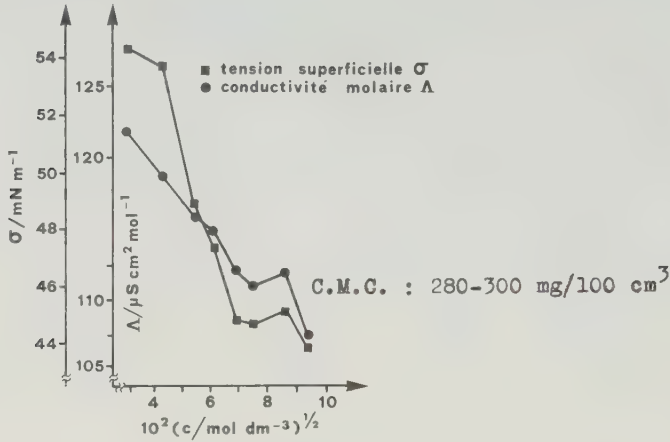


Tableau 2

Détermination de la tension superficielle du TCNa
dans des solutions tampons de pH 2,2 et 6,0

Concentration c c/mg (100 cm ³) ⁻¹	Tension superficielle σ $\sigma/\text{mN m}^{-1}$		
	$\bar{x} \pm s$		
	pH 2,2; 30°	pH 2,2; 37°	pH 6,0; 37°
25	53,8 $\pm$ 0,5	—	52,9 $\pm$ 1,5
50	49,2 $\pm$ 0,3	—	45,9 $\pm$ 0,7
100	44,9 $\pm$ 0,2	43,7 $\pm$ 0,6	44,0 $\pm$ 0,7
150	44,2 $\pm$ 0,3	—	42,9 $\pm$ 0,6
200	43,0 $\pm$ 0,2	41,8 $\pm$ 0,3	42,0 $\pm$ 0,3
250	43,9 $\pm$ 0,4	—	43,5 $\pm$ 0,3
300	43,8 $\pm$ 0,3	42,4 $\pm$ 0,4	43,7 $\pm$ 0,5
400	44,6 $\pm$ 0,3	44,0 $\pm$ 0,4	44,4 $\pm$ 0,6
500	44,0 $\pm$ 0,8	—	43,0 $\pm$ 1,0
600	—	44,9 $\pm$ 0,2	—

Figure 4

Détermination de la C.M.C. du TCNa dans le tampon de
pH 2,2 à 30°

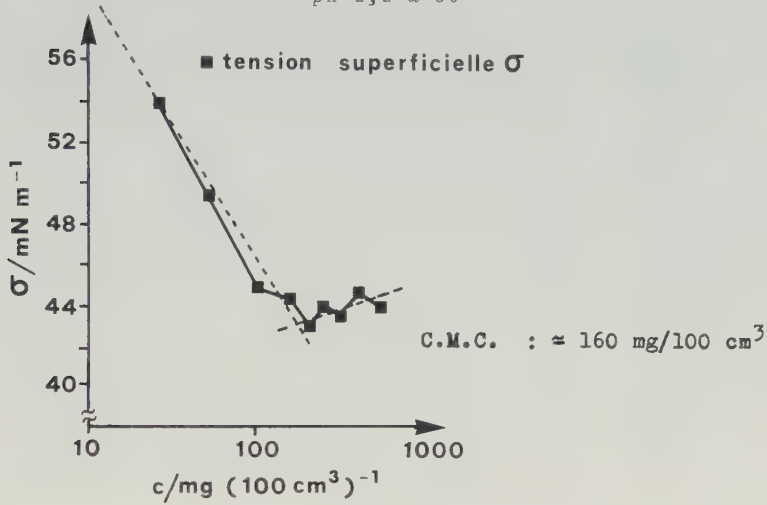


Figure 5

Détermination de la C.M.C. du TCNa dans le tampon de
pH 2,2 à 37°

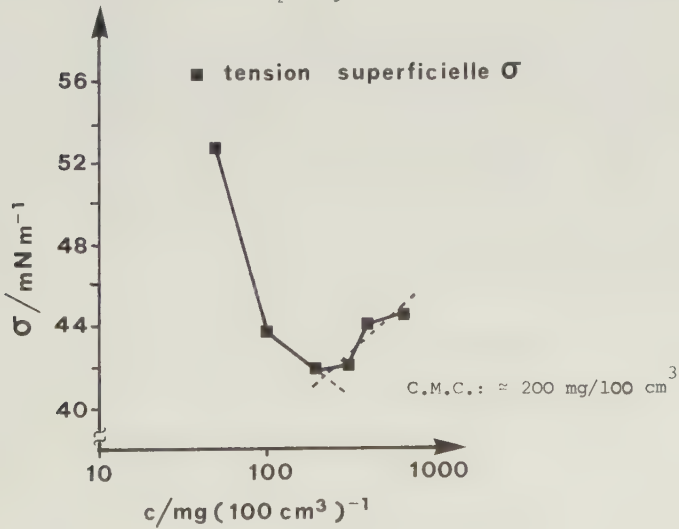
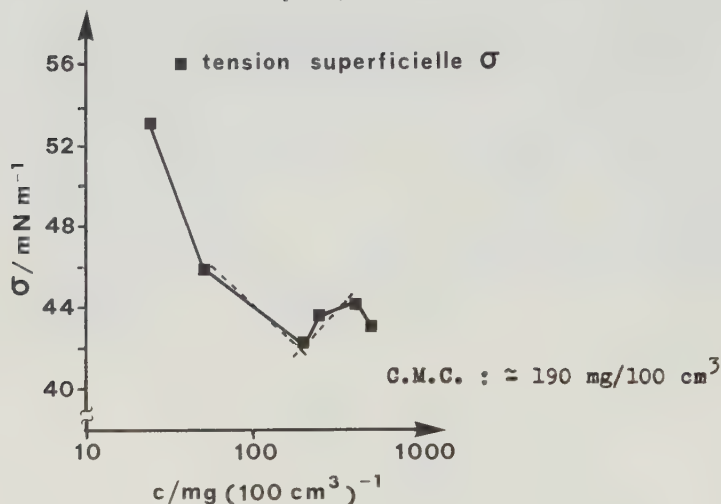


Figure 6

Détermination de la C.M.C. du TCNa dans le tampon de pH 6,0 à 37°



Les valeurs de C.M.C du TCNa utilisé se situent pour toutes les conditions entre 160 et 300 mg/100 cm³, en accord avec plusieurs résultats de la littérature¹¹. Elles sont basses dans les solutions en milieu tamponné. Cette diminution provient de la neutralisation des charges du tensio-actif par les électrolytes du tampon. Des observations semblables ont été réalisées par Kellaway et Mariott¹² et Small¹¹ avec différents sels biliaires.

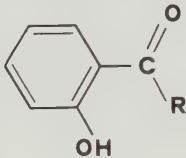
L'augmentation de la température semble produire une légère élévation de la C.M.C.. Small¹¹ a noté une diminution de la C.M.C. du taurocholate lorsque la température passe de 10 à 20°, puis une augmentation marquée, principalement à partir de 60°, aussi bien pour des solutions dans l'eau seule qu'en présence d'électrolytes.

II.3 Principes actifs

Les deux principes actifs étudiés sont le salicylamide et l'acide salicylique. Tous deux ont une solubilité relativement faible en solution aqueuse et une lipophilie assez importante. Ces caractéristiques peuvent justifier l'emploi de solutions micellaires. D'autre part, ces deux substances, très similaires dans leur formule et leur poids moléculaire ont des constantes de dissociation très différentes. Elle présentent en outre l'avantage d'avoir des métabolismes connus, en vue d'essais biologiques, des méthodes de dosage simples et une bonne stabilité dans les conditions d'expériences envisagées (tabl. 3).

Tableau 3

Propriétés physico-chimiques du salicylamide et de l'acide salicylique

	Salicylamide	Acide salicylique
Structure chimique	 R = NH₂ R = OH	
P.M.	137,1	138,1
pK _a	8,9	3,0
% non ionisé - pH 2,2 - pH 6,0	100,0 99,5	83,4 0,1
Solubilité/g dm ⁻³ eau, 30°	2,0	1,8
λ _{max} /nm	300,0	298,5
Provenance	Salicylamidum purum Siegfried, CH-4800 Zofingue	Acidum salicylicum Ph.Helv.VI/Eur. pulv. Siegfried, CH-4800 Zofingue
Produit marqué	New England Nuclear salicylamide 7- ¹⁴ C lot No 777-191	New England Nuclear ac. salicylique 7- ¹⁴ C lot No 910-033
Activité spécifique	8,5 mCi mmol ⁻¹	60 mCi mmol ⁻¹

III. Etude in vitro des interactions TCNa - principes actifs

Dans cette étude, les interactions envisagées sont celles qui découlent de la solubilisation micellaire et de ses conséquences sur la répartition du principe actif entre les différentes phases.

III.1 Phénomène de solubilisation micellaire

III.1.1 Définition et importance

Par *solubilisation micellaire*, on désigne l'augmentation de la solubilité d'une substance, due précisément à la présence, au-delà d'une certaine concentration limite, des micelles de tensio-actif. On peut également considérer la solubilisation micellaire comme une distribution du principe actif entre les deux phases en présence, aqueuse et micellaire. Ce partage joue un rôle très important dans les phénomènes de transport. En effet, les substances (principes actifs ou conservateurs) incorporées dans des formes galéniques contenant des tensio-actifs à des concentrations supérieures à la C.M.C., ne jouissent pas de la même disponibilité que si elles sont libres. La connaissance des coefficients de partage micellaire permet alors d'adapter les concentrations de substances actives à chaque situation.

III.1.2 Méthodes d'étude

Parmi les méthodes d'étude de l'interaction avec les protéines, certaines sont couramment utilisées dans le cas de la solubilisation micellaire :

- dialyse dynamique
- dialyse à l'équilibre
- mesure de solubilité
- ultrafiltration
- ultracentrifugation
- titration potentiométrique.

Ces procédés permettent de déterminer la concentration de principe actif dans les micelles et dans la phase aqueuse.

III.1.3 Description mathématique du phénomène

Lorsque l'on connaît la répartition du principe actif entre les deux phases, on peut adopter différentes interprétations pour caractériser l'interaction.

L'équation suivante permet de déterminer le coefficient de partage micelle/phase aqueuse $K_m^{13,14}$:

$$K_m = \frac{(D_m)}{(D_w)} \quad (4)$$

où D indique la quantité de substance active, les indices m et w renvoyant respectivement aux phases micellaire et aqueuse.

(D_m) représente la concentration en principe actif dans la phase micellaire, exprimée en fonction du volume de la phase considérée.

Les parenthèses carrées représentent les concentrations rapportées au volume total. La formule (4) devient :

$$K_m = \frac{[D_m]}{[D_w]} \cdot \frac{(1-v)}{v} \quad (5)$$

v = fraction volumique du tensio-actif

$(1-v)$ = fraction volumique de la phase aqueuse.

Si v est petit, $(1-v)$ tend vers l'unité et la formule (5) est souvent simplifiée en (5') :

$$K_m = \frac{[D_m]}{[D_w] \cdot v} \quad (5')$$

On peut calculer également la capacité de liaison k^{15} . A cet effet, on exprime le rapport R de la concentration totale de substance présente dans le milieu $[D_t]$ sur la concentration de cette même substance dans la phase aqueuse $[D_w]$, en fonction de la concentration en tensio-actif $[S]$:

$$R = \frac{[D_t]}{[D_w]} = 1 + k [S] \quad (6)$$

Dans certaines limites de concentration de tensio-actif, la fraction volumique est directement proportionnelle à la concentration^{14,16,17} et les équations (5') et (6) deviennent

$$\frac{[D_m]}{[D_w] [S]} = k' K_m = K'_m \quad (7)$$

où k' est une constante de proportionnalité et K'_m le coefficient de partage apparent.

Ainsi, les notions de partage et d'interaction se rejoignent-elles et dérivent du même phénomène.

Une autre interprétation fait appel à la loi d'action de masse, exprimée de la façon suivante^{17,18} :

$$r = \frac{nK[D_f]}{1+K[D_f]} \quad (8)$$

La concentration en principe actif libre $[D_f]$ correspond dans le cas de la solubilisation micellaire à $[D_w]$. Cette interprétation est souvent adoptée pour définir des interactions de principes actifs avec des protéines. Dans ce cas, n indique le nombre maximal de sites indépendants sur la macromolécule et K la constante d'association. Selon *Garrett*¹⁵, l'interaction avec les tensio-actifs peut être traitée de cette manière, r représentant alors le rapport molaire du principe actif fixé sur le liant impliqué, selon :

$$r = \frac{[D_m]}{[S]} \quad (9)$$

$[S]$ ne devrait représenter que la concentration en micelles, non additionnée des molécules à l'état de monomères. Cependant, la C.M.C., est généralement basse et l'on peut admettre cette simplification.

Un autre possibilité consiste à rapprocher l'équation (8) de l'équation de *Langmuir*¹⁷ :

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nK[D_w]} \quad (10)$$

L'équation (6) est un cas particulier de l'expression (8) et l'on obtient une seule courbe dans deux conditions :

$$- \text{ Si } [D_w] \longrightarrow 0, \quad \frac{nK}{1+K[D_w]} = nK, \text{ et}$$

$$r = 1+k [S]$$

$$\text{où } k = nK$$

$$- \text{ Si } [D_w] = \text{cte}, \quad \frac{nK}{1+K[D_w]} = k''$$

où k'' est identique à la constante de l'équation (6).

Les micelles ont des possibilités de liaison limitées et une seule valeur de k ou k'' n'est obtenue que pour certaines concentrations $[D_w]$.

L'équation (10), forme réciproque de l'équation (8), est mieux adaptée à une représentation graphique.

Si, en exprimant $1/r$ en fonction de $1/[D_w]$ la droite passe par l'origine, on admet que le mécanisme d'interaction correspond plutôt à un partage qu'à une adsorption du principe actif sur les micelles ou à des liaisons spécifiques.

Ce type de représentation augmente surtout l'importance des expériences effectuées à de petites valeurs de $[D_w]$. Il pourrait de ce fait conduire à des erreurs lors d'extrapolations à des concentrations supérieures en principe actif.

Un autre réarrangement de l'équation de base (8) correspond à la formule de *Scatchard*¹⁹ :

$$\frac{r}{[D_w]} = nK - rK \quad (11)$$

Cette transformation pondère l'influence de la concentration. Une idée correcte de l'interaction existante nécessite le balayage d'un grand nombre de concentrations $[D_w]$ différentes puis la détermination de n et K pour la région désirée. Si la pente est presque nulle, K tend vers zéro et n vers l'infini; cette situation indique une interaction non spécifique de très grande capacité à rapprocher du partage.

Enfin certains auteurs, comme *Ikeda et coll.*¹³, recourent à une interprétation basée sur l'isotherme de

Freundlich :

$$\frac{[D_m]}{[S]} = K_f [D_w]^n \quad (12)$$

où K_f = capacité de l'adsorbant
 n = intensité de l'adsorption.

Cette équation est linéaire sous forme logarithmique :

$$\log \frac{[D_m]}{[S]} = \log K_f + n \log [D_w] \quad (13)$$

S'il s'agit d'un partage, n se rapproche de l'unité et la valeur du coefficient de partage K'_m peut être considérée équivalente à la constante de *Freundlich* (13) ou au produit nK de l'équation de *Langmuir* (8).

III.1.4 Revue de la littérature

Pour résumer l'ensemble des travaux consacrés à la solubilisation micellaire, le tableau 4 mentionne les tensio-actifs et les substances médicamenteuses ainsi que les méthodes d'études utilisés.

Tableau 4

Travaux relatifs à la solubilisation micellaire

Tensio-actifs	Principes actifs	Méthodes [*]	Réf.
Polysorbate 80	Sécobarbital, éthanol	- Dialyse à l'équilibre (polyamide)	20
"	Chloramphénicol, acide benzoïque	- Dialyse dynamique - Dialyse à l'équilibre (polydiméthylsiloxane) - Solubilité	21
"	Salicylate Na, benzocaïne	- Dialyse dynamique (cellulose)	22
"	p-Hydroxybenzoate de méthyle	- Dialyse à l'équilibre (polyamide) - Solubilité	23
"	Chlorbutanol, alcool benzylique et phényléthylique	- Dialyse à l'équilibre (polyamide, cellophane)	24
"	p-Hydroxybenzoate de méthyle	- Dialyse dynamique (polyamide)	25
"	Esters acide p-hydroxyben- zoïque	- Inhibition croissance bactérienne	26
"	Chlorure de cétylpyridi- nium	- Dialyse à l'équilibre (polyamide) - Inhibition bactérienne	27
"	Salicylamide	- Dialyse à l'équilibre (cellulose)	28
"	Ammoniums quaternaires	- Dialyse à l'équilibre (polyamide)	29

Tableau 4 (suite)

Tensio-actifs	Principes actifs	Méthodes *	Réf.
Polysorbate 80	Procaïne, acide salicylique, sulfamides	- Ultracentrifugation	30
"	Chlorpromazine	- Dialyse à l'équilibre (cellulose)	31
"	Dérivés de la prednisolone, procaïne	- Solubilité	32
Polysorbates	Barbituriques	- Solubilité	33
Polysorbate 20	Dérivés de l'acide benzoïque	- Solubilité	34
"	"	- Dialyse dynamique (cellophane)	35
Polysorbates 20 et 80	Acide salicylique	- Dialyse à l'équilibre	36
"	"	- Dialyse dynamique (cellophane)	37
Polysorbate 80, laurylsulfate Na, cholate Na	Amobarbital	- Dialyse dynamique (polydiméthylsiloxane)	38
Polysorbates 40 et 80	Ephédrine, sulfathiazole, chloramphénicol, paracétamol, isoniazide	- Dialyse à l'équilibre (polyamide)	39

Tableau 4 (suite)

Tensio-actifs	Principes actifs	Méthodes *	Réf.
Polysorbate 80, chlorure de cétalpyridi- nium, laurylsulfate Na	Chlordiazépoxide	- Dialyse dynamique (polydiméthylsiloxane)	40
Polysorbate 80, laurylsulfate Na	Phénobarbital	- Solubilité	41
Polysorbates, stéarate de polyéthylène- glycol	Acide salicylique	- Solubilité	2
n-Alcoylpolyéthylène- glycol	Dérivés de la cortisone	- Dialyse dynamique (cellulose)	42
"	Acide benzoïque	- Dialyse à l'équilibre (polyamide) - Solubilité	43
Ether laurique du polyéthylèneglycol	Barbituriques	- Solubilité - Dialyse dynamique - Dialyse à l'équilibre (cellulose)	13
Cétomacrogol	Acide benzoïque, chloroxylénol	- Dialyse à l'équilibre - Solubilité	44
"	Acide benzoïque et esters, chloroxylénol	- Solubilité - Dialyse à l'équilibre (polyamide)	45
"	Chlorocrésol	- Dialyse dynamique - Dialyse à l'équilibre (cellophane, polydimé- thylsiloxane - Ultrafiltration	46

Tableau 4 (suite)

Tensio-actifs	Principes actifs	Méthodes *	Réf.
Cétomacrogol	Acide benzoïque	- Dialyse à l'équilibre (polyamide) - Solubilité	17
"	Ester de l'acide p-aminobenzoïque, chloroxylénol	- Dialyse dynamique - Dialyse à l'équilibre (polyamide)	18
"	Esters de l'acide p-aminobenzoïque	- Dialyse à l'équilibre - Dialyse dynamique (cellophane)	16
Polysorbate 80, cétomacrogol 1000	Dérivés de l'acide p-aminobenzoïque, p-chlorophénol, acide sorbique	- Dialyse à l'équilibre (polyamide)	47
Polysorbate 80, cétomacrogol 1000	Dérivés de l'acide benzoïque	- Dialyse à l'équilibre (polyamide)	48
Polysorbates, cétomacrogol	Acide benzoïque, acide sorbique, chlorocrésol, chloroxylénol, esters de l'acide p-amino-benzoïque	- Dialyse à l'équilibre (polyamide)	49
Polysorbate 80, polyéthylèneglycol 4000	Esters de l'acide p-aminobenzoïque, phénols	- Dialyse à l'équilibre (polyamide) - Solubilité	50
Polysorbates, stéarates de polyéthylène-glycol, éthers lauriques de polyéthylèneglycol	Sulfamides	- Dialyse à l'équilibre (cellulose) - Solubilité	51

Tableau 4 (suite)

Tensio-actifs	Principes actifs	Méthodes *	Réf.
Laurylsulfate Na, polyéthylèneglycol 1000	Dérivés de l'acide p-aminobenzoïque, chloroxylénol	- Solubilité	52
Glycocholate Na, taurocholate Na, laurylsulfate Na	Chlorpromazine	- Dialyse dynamique (polydiméthyl- siloxane)	53
Taurocholate Na, glycocholate Na, désoxycholate Na, cholate Na	Hexoestrol, griséofulvine, gluthéthimide	- Solubilité	14
Cholate Na	Naphtalène	- Solubilité	54
Dodécylsulfate Na, cétrimide	Chloramphénicol	- Dialyse dynamique (cellophane)	55

* La nature de la membrane utilisée est indiquée entre parenthèses.

III.2 Méthode de la solubilité

III.2.1 Rappel théorique

Cette méthode permet de déterminer et de caractériser le phénomène de solubilisation micellaire. Elle repose sur l'observation de plusieurs auteurs^{14,23,41,43,56,57}, qui ont montré que la solubilité de nombreuses substances peu solubles ou pratiquement insolubles augmente en présence d'un tensio-actif dans le milieu.

Cette technique, contrairement à d'autres dont les différentes dialyses, offre uniquement des informations pour des expériences où les concentrations en principe actif sont voisines de la saturation.

McBain⁵⁸ définit la solubilisation micellaire comme un "passage spontané de molécules de substance insoluble dans l'eau dans une solution aqueuse de tensio-actif, avec formation d'une solution thermodynamiquement stable". Il propose trois types de mécanismes :

- *Solubilisation non polaire* (non spécifique) :

la substance solubilisée est incorporée au centre de la micelle.

- *Solubilisation polaire - non polaire* (spécifique) :

incorporation avec pénétration dans la couche palissadique de la micelle; les molécules s'orientent comme celles du tensio-actif formant la micelle.

- *Solubilisation par adsorption* :

la substance est adsorbée sur les surfaces polaires de la micelle.

La solubilité augmente proportionnellement à la concentration de tensio-actif présent. La relation est le plus souvent linéaire^{32,41,59,60}. L'étude de la variation de la solubilité en fonction de la concentration d'adjuvant permet de calculer pour chaque cas, la quantité de principe actif

solubilisé; elle correspond à la différence des concentrations dans le milieu, avec et sans adjuvant⁷³.

D'autre part, la solubilisation micellaire varie suivant les tensio-actifs et les produits testés, ainsi qu'en fonction de la température et de la nature du milieu étudié. En effet, tout facteur influençant la formation des micelles, leur taille ou leur structure, peut modifier les propriétés solubilisantes⁶¹. Ces dernières, comme le montrent *Ismail et coll.*³³, s'intensifient si les micelles sont plus grandes.

III.2.2 Mode opératoire

Les mesures de solubilité sont effectuées dans des flacons d'Erlenmeyer rodés de 100 ml, à double paroi. On introduit 50 ml d'eau ou de solution tampon contenant différentes concentrations de TCNa, ainsi qu'un léger excès de principe actif. Le liquide est soumis à une agitation magnétique jusqu'à l'équilibre (env. 48 h).

Les échantillons sont prélevés au moyen de pipettes maintenues à la température de l'expérience. La solution recueillie est filtrée sur papier filtre, jusqu'au volume final, dans un ballon jaugé contenant déjà la quantité de solution destinée à la dilution, dans le but de prévenir toute précipitation. Chaque prélèvement est dilué en deux étapes afin de permettre une lecture spectrophotométrique (env. 400 fois).

Les mesures sont effectuées au spectrophotomètre à 300 nm pour le salicylamide et à 295 nm pour l'acide salicylique.

Comme d'autres auteurs^{14,62}, nous avons vérifié que le taurocholate, aux dilutions utilisées, n'interfère pas dans le dosage du principe actif.

III.2.3 Résultats et commentaires

Afin de mieux caractériser le pouvoir solubilisant du taurocholate de sodium à l'égard des deux principes actifs, nous définissons, comme Delaloye⁶¹, les termes suivants :

- La *solubilité* S_w est la concentration du principe actif dans le milieu exempt d'adjuvant. Elle correspond à la concentration dans la phase aqueuse $[D_w]$.
- La *solubilité totale* S_t , concentration dans le milieu avec adjuvant, correspond à la somme des concentrations des phases aqueuses $[D_w]$ et micellaire $[D_m]$, soit à $[D_t]$.
- La *solubilisation* S_m , concentration du principe actif solubilisé par les micelles, équivaut à la différence entre solubilité totale et solubilité, soit $S_t - S_w$. Elle correspond à $[D_m]$.
- Le *degré de solubilisation* représente le quotient de la solubilité totale sur la solubilité, soit S_t / S_w .

Selon les auteurs, différentes représentations des résultats sont adoptées. Cependant, la plupart^{13,43,44,61} comparent, en variant les produits employés ou les conditions

d'expérimentation, la solubilité totale ou le degré de solubilisation. De plus, compte tenu de la correspondance entre fractions volumiques et concentrations du tensio-actif, le coefficient de partage apparent K'_m peut être calculé à partir de la pente du graphique exprimant le degré de solubilisation, S_t/S_w , en fonction de la concentration en tensio-actif $[S]$.

Les tableaux 5 et 6 pour le salicylamide et 7 pour l'acide salicylique regroupent les mesures de solubilité effectuées.

Tableau 5

Mesure de la solubilité du salicylamide dans l'eau en présence de quantités croissantes de TCNa, à 3 températures différentes

Concentration TCNa /mmol dm ⁻³	Solubilité /mmol dm ⁻³ $\bar{x} \pm s$		
	30°	37°	45°
0	23,1 $\pm$ 0,3	30,5 $\pm$ 1,0	43,6 $\pm$ 0,5
1,86	24,1 $\pm$ 0,4	31,8 $\pm$ 0,4	44,5 $\pm$ 1,7
3,72	24,5 $\pm$ 0,2	32,9 $\pm$ 0,3	43,4 $\pm$ 2,5
7,44	25,5 $\pm$ 0,4	33,2 $\pm$ 1,0	46,9 $\pm$ 3,0
11,16	26,1 $\pm$ 0,1	—	49,0 $\pm$ 1,2
14,88	27,0 $\pm$ 0,2	35,6 $\pm$ 0,3	50,3 $\pm$ 2,5
18,60	28,1 $\pm$ 0,5	—	51,4 $\pm$ 0,5
22,32	30,8 $\pm$ 0,2	—	54,0 $\pm$ 2,6

Tableau 6

Mesure de la solubilité du salicylamide dans des solutions tampons de pH 2,2 et 6,0 en présence de quantités croissantes de TCNa, à 37°

Concentration TCNa /mmol dm ⁻³	Solubilité /mmol dm ⁻³ $\bar{x} \pm s$	
	pH 2,2	pH 6,0
0	31,0 $\pm$ 1,2	28,9 $\pm$ 0,8
3,72	30,8 $\pm$ 1,2	30,0 $\pm$ 1,9
7,44	31,5 $\pm$ 2,5	31,1 $\pm$ 0,3
11,16	33,4 $\pm$ 1,8	31,7 $\pm$ 1,0
14,88	35,5 $\pm$ 4,3	32,3 $\pm$ 1,3
18,60	36,3 $\pm$ 2,4	34,0 $\pm$ 1,1

Tableau 7

Mesure de la solubilité de l'acide salicylique dans une solution tampon de pH 2,2 en présence de quantités croissantes de TCNa, à 30° et 37°

Concentration TCNa /mmol dm ⁻³	Solubilité /mmol dm ⁻³ $\bar{x} \pm s$	
	30°	37°
0	16,8 $\pm$ 0,2	21,8 $\pm$ 0,1
1,86	16,9 $\pm$ 0,2	—
3,72	17,2 $\pm$ 0,2	22,6 $\pm$ 0,4
7,44	17,7 $\pm$ 0,8	22,4 $\pm$ 0,4
14,88	19,3 $\pm$ 0,4	25,1 $\pm$ 0,4
22,32	21,1 $\pm$ 0,6	26,5 $\pm$ 0,4

Les représentations de la solubilité en fonction de la concentration en TCNa correspondent à des relations linéaires pour chacune des conditions. Un test de linéarité a permis de vérifier cette propriété avant de calculer les droites de régression, présentées sur les figures 7 à 9.

Figure 7

Solubilité du salicylamide dans l'eau à trois températures

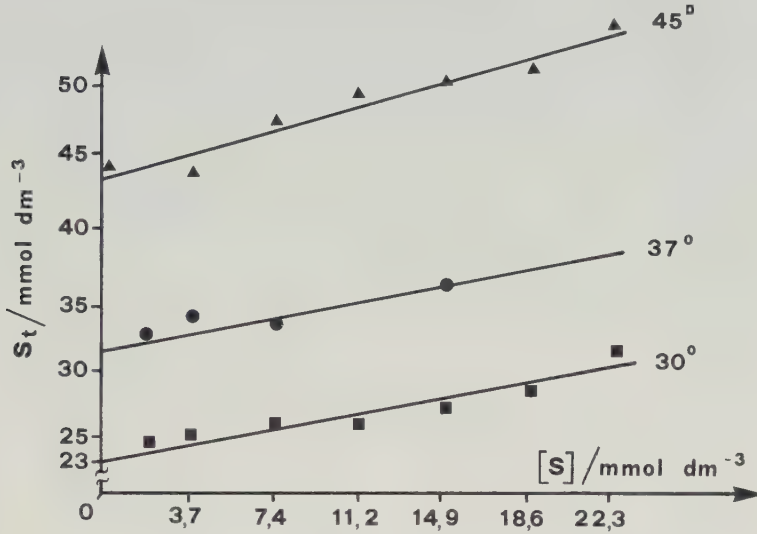


Figure 8

Solubilité du salicylamide dans les deux tampons, à 37°

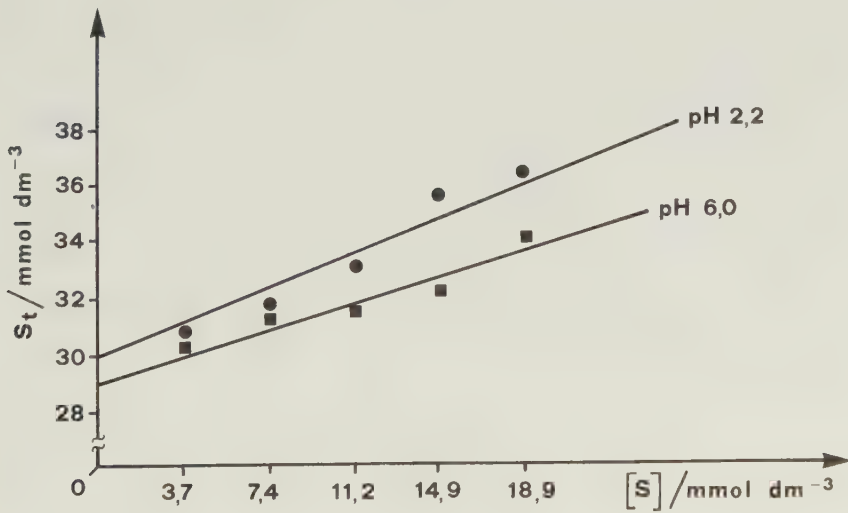
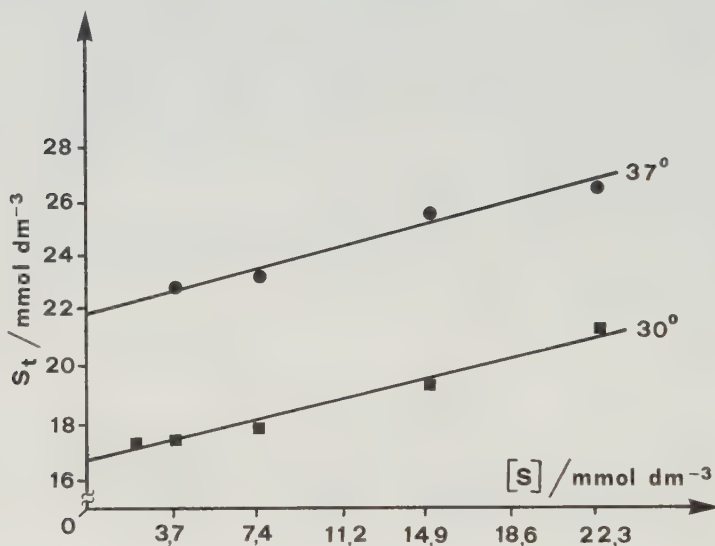


Figure 9

*Solubilité de l'acide salicylique à deux températures,
à pH 2,2*



Pour les deux dérivés, la solubilité ainsi que la solubilisation micellaire (pente des droites), augmentent avec l'élévation de la température. L'influence du milieu tampon n'est pas très manifeste; toutefois, en milieu acide, la solubilisation micellaire se révèle un peu plus importante.

Lorsqu'on porte le degré de solubilisation en fonction de la concentration d'adjuvant, on obtient une droite passant par l'unité :

$$\frac{S_t}{S_w} = 1 + b' [S] \quad (14)$$

Sa pente indique le coefficient de partage K'_m .

Le tableau 8 récapitule les valeurs de K'_m ainsi que les coefficients de corrélation correspondant à l'équation (14).

Tableau 8

Coefficients de partage apparents

Conditions	$K'_m / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	r^2
S A L I C Y L A M I D E		
Eau, 30°	13,1	0,985
Eau, 37°	12,1	0,964
Eau, 45°	10,3	0,987
pH 6,0, 37°	9,2	0,991
pH 2,2, 37°	8,4	0,926
A C I D E S A L I C Y L I Q U E		
pH 2,2, 30°	10,9	0,988
pH 2,2, 37°	9,9	1,000

Avec les deux dérivés, nous constatons une diminution du coefficient de partage apparent K'_m , lorsque la température augmente. Ces observations sont en accord avec des expériences de solubilité effectuées par d'autres auteurs^{13,14,43}.

En milieu acide, la valeur de K'_m est plus faible qu'en milieu proche de la neutralité.

III.3 Méthode de la dialyse à l'équilibre

III.3.1 Rappel théorique

Une deuxième méthode fréquemment employée dans l'étude des différents types d'interaction est la dialyse à l'équilibre. Elle permet notamment la mise en évidence des phénomènes de complexation et d'une façon générale de toute liaison entre molécules de faible poids moléculaire et divers adjuvants tels que protéines, tensio-actifs ou macromolécules. Contrairement à la technique de la solubilité, elle présente l'avantage de la possibilité de faire varier la concentration du principe actif.

Klotz⁶³, en 1946, est un des premiers à utiliser la dialyse à l'équilibre afin d'étudier la liaison d'un principe actif avec des protéines. Depuis lors, de nombreux chercheurs ont recours à ce procédé, en variant les adjuvants examinés : tensio-actifs naturels et de synthèse^{13,18,20,22,31,39,46-48} ou macromolécules⁶⁴⁻⁶⁸.

Les cellules de dialyse comportent généralement deux compartiments séparés par une membrane permettant seulement la diffusion des petites molécules. Aussi, après un certain laps de temps, les deux concentrations de diffusant atteignent-elles un équilibre de part et d'autre de cette membrane. S'il existe un phénomène de liaison quelconque avec l'adjuvant, la concentration ne sera pas égale dans les deux compartiments. Ainsi, on peut déduire de la différence la proportion de molécules participant à la liaison.

Les équations (15) et (16) illustrent cette répartition. Les indices i et e renvoient respectivement aux compar-
timents interne (avec adjuvant) et externe (sans adjuvant).
La lettre r équivaut au nombre moyen de molécules de principe
actif lié (indice b) par molécule d'adjuvant, la forme libre
étant désignée par f.

$$[D_i] = [D_f] + [D_b] = [D_f] + r[S] \quad (15)$$

$$[D_e] = [D_f] \quad (16)$$

Dans ce type d'expérience, il est intéressant d'ef-
fectuer des essais avec plusieurs valeurs différentes de $[S]$,
tout en maintenant fixe la quantité de molécules diffusantes.
Il est ainsi possible de déterminer r et de démontrer qu'il
peut prendre une valeur bien définie, indépendant de $[S]$, tout
au moins dans les limites des concentrations étudiées.

Si le principe actif comporte une charge, sa liaison
avec l'adjuvant modifie la diffusion des ions libres, conformé-
ment à la loi d'équilibre de Donnan.

Le transport à travers la membrane obéit à la
première loi de Fick. La vitesse de passage dépend de la surface
effective et de l'épaisseur de la membrane, du gradient de con-
centration et du coefficient de diffusion. Ce dernier est fonc-
tion de la température et de la nature de la substance envisagée.

En pratique, la membrane, barrière entre les deux compartiments, doit être choisie telle qu'elle permette une vitesse de diffusion suffisamment élevée et qu'elle retienne l'adjuvant pendant toute la durée de l'expérience. Les membranes artificielles solides utilisées dans les dialyses peuvent être de différents types⁶⁹ :

- membranes polymérisées poreuses (membranes hétérogènes)
- membranes polymérisées non poreuses (membranes homogènes)
- membranes lipidiques composées non poreuses.

Le choix de l'une ou l'autre de ces membranes dépend de l'adjuvant étudié, de sa taille, de sa structure et de la durée de l'expérience. Dans le cas précis des dialyses à l'équilibre, les essais relativement longs nécessitent que la membrane soit totalement imperméable à l'adjuvant. Parmi les membranes poreuses, nous citerons celles de cellophane⁷⁰⁻⁷² et autres dérivés cellulosiques^{13,22,73}.

Plusieurs expériences ont été effectuées avec des membranes non poreuses comme celles de polydiméthylsiloxane^{3,49} ou de polyamide⁴⁹.

Parmi les membranes lipidiques composées, mentionnons celles formées de filtres Millipore^R saturés de myristate d'isopropyle employées dans des dialyses à l'équilibre par Hayton⁷⁴.

III.3.2 Mode opératoire

Pour ces expériences, nous avons employé un appareil de dialyse DIANORM (Diachema S.A., CH-8803 Rüschlikon)⁷⁵, utilisé précédemment dans des études semblables⁷⁶⁻⁷⁹. Il est constitué d'un ensemble de cinq cellules juxtaposées. Chacune d'elles comprend deux compartiments égaux d'une capacité de 5,4 ml, entre lesquels la membrane est fixée. Sa surface de contact avec chaque chambre est de 11,3 cm². Ce bloc de cellules est disposé dans un bain thermostatisé et entraîné par un moteur dont la vitesse de rotation est de 20 tpm.

Dans chaque compartiment, on introduit 3 ml de solution afin d'obtenir un rapport surface de la membrane/volume de solution le plus élevé possible (ici égal à 3,7). On remplit en premier lieu tous les compartiments récepteurs puis on introduit dans les autres la solution contenant le principe actif et le sel biliaire.

Le remplissage des chambres s'effectue par les orifices latéraux au moyen d'une seringue munie d'un embout approprié. Pendant cette opération, un orifice doit rester ouvert pour permettre à l'air de s'échapper.

Nous avons employé des membranes Silastic^R (type 500-1, Dow Corning Corp., Michigan), en raison de leur imperméabilité à l'égard du sel biliaire. Ces membranes non poreuses homogènes, constituées d'un polymère du diméthylsiloxane, possèdent en outre la caractéristique d'empêcher la diffusion des ions des solutions tampons^{80,81}. Avant la dialyse les feuilles

de Silastic^R sont découpées aux dimensions désirées, placées dans du méthanol pour analyse pendant une nuit, puis lavées et conservées dans de l'eau distillée^{53,82}.

Des expériences préliminaires ont montré que l'équilibre est atteint après quatre à cinq jours et que dans ce laps de temps le taurocholate de sodium ne diffuse pas. Nous nous sommes également assuré de l'absence d'adsorption du principe actif ou de l'adjuvant sur la membrane ou sur les parois, ainsi que de l'égalité des volumes des solutions de part et d'autre de la barrière.

En raison de la faible capacité des compartiments, l'emploi des produits marqués s'est imposé pour le dosage des principes actifs. A l'équilibre, on effectue 3 prélèvements de 40 µl dans chaque compartiment. L'échantillon introduit dans un flacon plastique (Packard, No 6008117) est additionné de 10 ml de solvant de scintillation (PPO 8,0 g, diméthyl-POPOP 0,08 g, naphtalène 100 g, dioxanne ad 1 litre).

En utilisant la méthode du standard interne (Toluène ¹⁴C), les flacons sont analysés au compteur à scintillation liquide (TRI/CARB 2425 Packard, 2 cycles de 2 comptages de 10 min).

III.3.3 Résultats et commentaires

Les résultats des dialyses pour différentes conditions de pH et de température sont rapportés dans les tableaux 9 (salicylamide) et 10 (acide salicylique).

Tableau 9

Dialyse à l'équilibre du salicylamide

Concentration initiale P.A. /mmol dm ⁻³	Concentration TCNa [S] /mmol dm ⁻³	Concentration P.A. à l'équilibre [D _t]/mmol dm ⁻³ [D _f]/mmol dm ⁻³	
E A U A 30°			
2,19	18,60	1,22	0,97
4,38	18,60	2,41	1,96
6,56	18,60	3,52	3,05
8,75	18,60	5,02	3,73
6,56	3,72	3,40	3,17
6,56	33,48	3,70	2,86
E A U A 37°			
2,19	22,32	1,23	0,96
4,38	22,32	2,54	1,83
6,56	22,32	3,73	2,83
13,13	22,32	7,40	5,72
13,13	3,72	6,99	6,13
13,13	7,44	7,15	5,97
13,13	14,88	7,26	5,87
T A M P O N D E p H 6,0 A 37°			
2,19	22,32	1,24	0,95
4,38	22,32	2,43	1,95
6,56	14,88	3,56	3,00
6,56	7,44	3,42	3,15
T A M P O N D E p H 2,2 A 37°			
2,19	22,32	1,20	0,99
4,38	22,32	2,47	1,96
6,56	22,32	3,65	2,95
6,56	14,88	3,57	3,09
6,56	7,44	3,41	3,13

Tableau 10

Dialyse à l'équilibre de l'acide salicylique

Concentration initiale P.A. /mmol dm ⁻³	Concentration TCNa [S] /mmol dm ⁻³	Concentration P.A. à l'équilibre [D _t]/mmol dm ⁻³ [D _f]/mmol dm ⁻³	
T A M P O N D E p H 2,2 A 30°			
3,62	18,60	2,03	1,59
7,24	18,60	4,05	3,19
14,48	18,60	8,08	6,40
14,48	3,72	7,39	7,09
14,48	11,16	7,65	6,83
14,48	22,32	8,24	6,24
T A M P O N D E p H 2,2 A 37°			
3,62	22,32	2,03	1,59
7,24	22,32	4,06	3,18
14,48	22,32	8,31	6,17
14,48	3,72	7,37	7,11
14,48	11,16	7,42	7,06

A l'instar de la plupart des auteurs, nous calculons les valeurs $R (= [D_t]/[D_f])$ et déterminons, pour chaque condition d'expérience, la pente de l'équation (6). Nous comparons également les rapports molaires $r (= [D_m]/[S])$ à concentration égale de principe actif (cf. (9)).

D'autre part, à titre d'illustration et afin d'évaluer l'influence des transformations apportées aux résultats sur les paramètres caractéristiques de l'interaction, nous appliquons, pour une condition de température et de pH donnée, les diverses interprétations décrites sous III.3.1 (*Langmuir, Freundlich, Scatchard*).

La représentation de la concentration $[D_m]$ (différence des concentrations entre les deux compartiments) en fonction de la concentration en taurocholate est linéaire dans cet intervalle. Elle correspond à la valeur de r et indique la capacité de liaison du tensio-actif. Les valeurs sont présentées dans le tableau 11, ainsi que les pentes des graphiques de R en fonction de $[S]$. La valeur de R équivaut au quotient des concentrations des deux compartiments^{22, 24, 68, 83}.

Tableau 11

Paramètres de capacité de liaison du TCNa

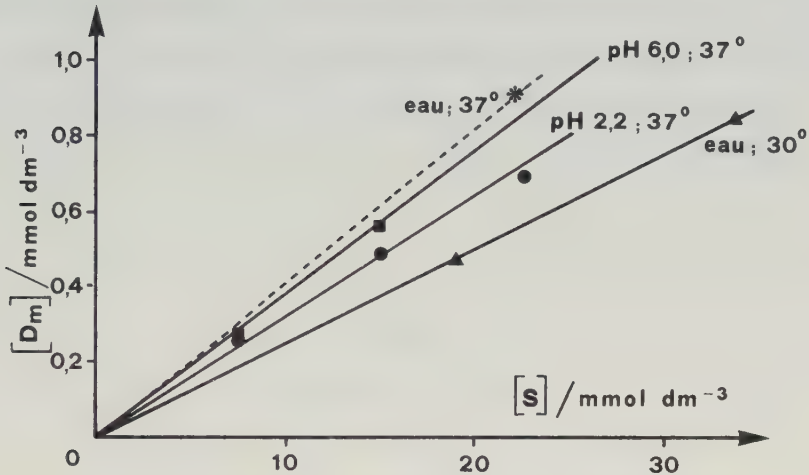
Conditions	r	$k/\text{dm}^3 \text{ mmol}^{-1}$
S A L I C Y L A M I D E		
Eau; 30°	0,025 ($r^2 = 0,987$)	0,009
Eau; 37°	0,089 ($r^2 = 0,962$)	0,015
pH 6,0; 37°	0,038 ($r^2 = 1,000$)	0,013
pH 2,2; 37°	0,032 ($r^2 = 1,000$)	0,011
A C I D E S A L I C Y L I Q U E		
pH 2,2; 30°	0,087 ($r^2 = 0,996$)	0,014
pH 2,2; 37°	0,095 ($r^2 = 0,998$)	0,016

Il est intéressant de comparer la variation de la concentration micellaire $[D_m]$ en fonction de $[S]$ pour une substance à concentration fixe mais dans diverses conditions.

A cet égard, la figure 10 fait apparaître une similitude entre les expériences effectuées à pH 6,0 et dans l'eau, à la même température de 37°. A concentrations identiques de salicylamide et de TCNa, la quantité incorporée dans les micelles augmente avec la température.

Figure 10

Influence du pH et de la température sur la capacité de liaison du salicylamide



Si nous comparons les pentes (k) obtenues avec l'équation (6), nous remarquons qu'elles sont plus fortes en milieu de pH 6,0 que dans le milieu plus acide. L'élévation de la température correspond à une augmentation de k pour les deux substances. Cette seconde constatation est en opposition avec les observations faites, pour la même interprétation, avec la méthode de solubilité. La pente représente une évaluation du coefficient de partage apparent K'_m qui dépend, selon Kazmi et Mitchell¹⁷, non seulement de la concentration libre $[D_f]$, mais du degré de saturation de la phase aqueuse. Dans le cas de la solubilité, ce dernier est constant,

alors que dans les dialyses, il varie d'une température à l'autre. Selon les mêmes auteurs, une diminution de $[D_f]$ ou du degré de saturation conduit à des valeurs de K'_m plus élevées.

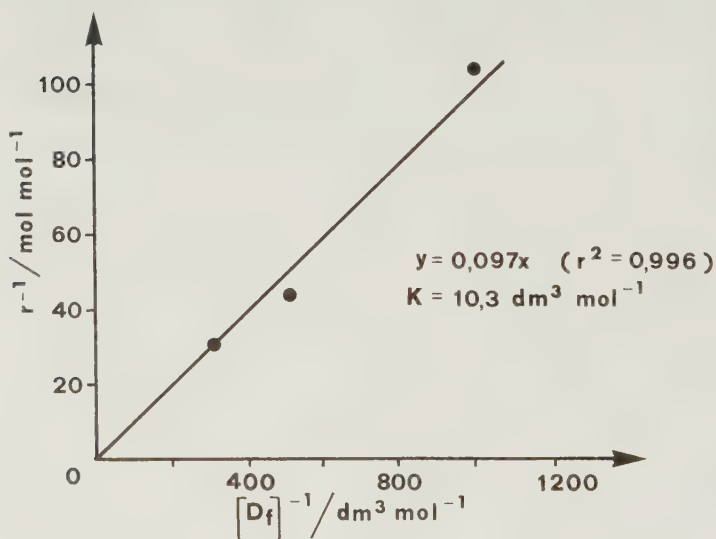
Les essais à concentration fixe de TCNa permettent de déterminer les paramètres n et K de la loi d'action de masse (8). A cet effet, le recours aux divers isothermes, est fréquent^{10,13,24,47,51,71}.

Isotherme de Langmuir

Figure 11

Isotherme de Langmuir

(Salicylamide; pH 2,2; 37°; $[S] = 22,32 \text{ mmol dm}^{-3}$)



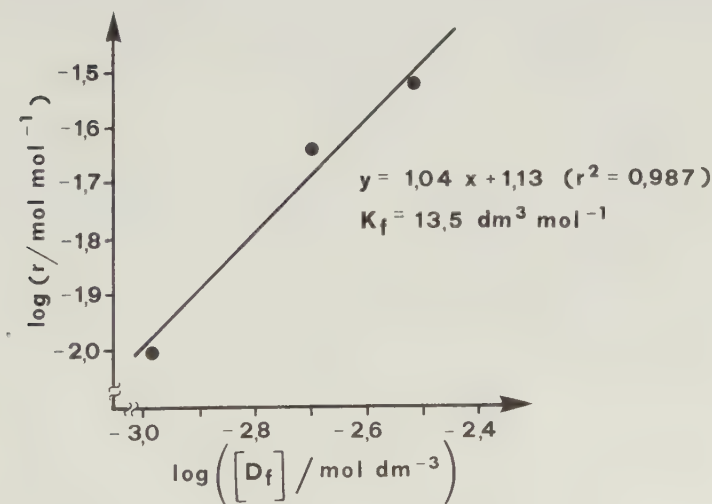
La représentation correspond à une droite passant par l'origine, indiquant par là une capacité de liaison infinie, puisque la valeur n , inverse de l'ordonnée à l'origine de l'équation (10) est elle-même infinie. L'inverse de la pente correspond à K . Dans cette représentation, les expériences sont réparties sur une large gamme de valeurs de $1/D_f$, ce qui conduit à une estimation assez réelle des paramètres.

Isotherme de Freundlich

Figure 12

Isotherme de Freundlich

(Salicylamide; pH 2,2; 37°; $[S] = 22,32 \text{ mmol dm}^{-3}$)

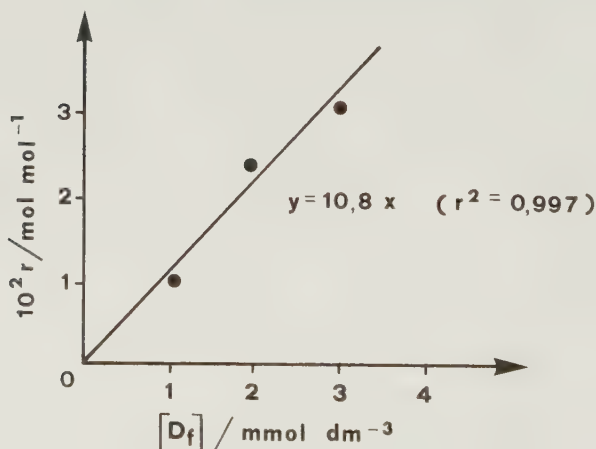


L'isotherme (13) présente une bonne linéarité et la pente voisine de l'unité confirme la notion de partage équivalant à une liaison infinie. Toutefois cette représentation n'est pas très judicieuse pour la détermination de K , car l'extrapolation de l'ordonnée à l'origine est éloignée des points expérimentaux et conduit à des erreurs d'estimation.

La figure 13 est une simplification de l'isotherme de *Freundlich*, rendue possible lorsque $1/n$ vaut l'unité⁵¹ (12).

Figure 13

Isotherme de Freundlich simplifié
(Salicylamide; pH 2,2; 37°; $[S] = 22,32 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Ce graphique est linéaire dans les limites expérimentales et passe par l'origine. Sa pente correspond au coefficient de partage apparent K'_m . Sa valeur est très voisine de celle obtenue par l'isotherme de *Langmuir*.

Equation de Scatchard

Il découle de la précédente représentation que les quotients $r/[D_w]$ sont constants; la pente de l'équation de *Scatchard*^{23,31,45,49} est donc nulle¹⁸.

L'examen de ces différentes interprétations permet de conclure que l'interaction relève d'un partage, assimilable à une liaison de capacité infinie. L'isotherme de *Langmuir* assure une bonne répartition des points expérimentaux et conduit à une interprétation précise. C'est la raison pour laquelle nous avons récapitulé les valeurs de K'_m ainsi obtenues dans le tableau 12.

Tableau 12

Influence des conditions expérimentales sur K'_m calculé selon Langmuir

Conditions	Pente /mol dm ⁻³	K'_m /dm ³ mol ⁻¹	r^2
S A L I C Y L A M I D E			
Eau; 30°	0,073	13,7	0,978
Eau; 37°	0,075	13,4	0,967
pH 6,0; 37°	0,076	13,2	0,989
pH 2,2; 37°	0,097	10,3	0,996
A C I D E S A L I C Y L I Q U E			
pH 2,2; 30°	0,069	14,5	1,000
pH 2,2; 37°	0,080	12,5	0,997

Dans ce cas, nous observons à nouveau une grande similitude entre les résultats du salicylamide dans l'eau et dans le tampon de pH 6,0. Ces valeurs sont plus élevées qu'en milieu plus acide. D'autre part, pour des conditions identiques, l'acide salicylique manifeste des affinités plus fortes pour la phase micellaire que le salicylamide. Enfin, la température joue le même rôle sur le coefficient de partage que dans la méthode de solubilité.

III.4 Méthode de la dialyse dynamique

III.4.1 Rappel théorique

Les méthodes utilisant les différences de vitesse de dialyse sont également employées pour caractériser les liaisons de petites molécules avec divers adjuvants. La technique de la dialyse dynamique présente l'avantage d'être réalisée en un temps plus court que celle à l'équilibre.

Le transport des petites molécules par diffusion obéit à la première loi de Fick qui peut s'exprimer, en régime constant, de la manière suivante :

$$J = - D \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad (17)$$

J symbolise le flux, c'est-à-dire la quantité de matière passant perpendiculairement à travers une unité de surface par unité de temps. dc/dx représente le gradient de

concentration et D le coefficient de diffusion. Expérimentalement, les conditions d'un tel régime sont rarement satisfaites, aussi recourt-on au concept de diffusion en régime quasi constant. Dans ce cas, on peut admettre que le gradient de concentration ne change que faiblement au cours du temps.

Dans le cas de la méthode de la dialyse dynamique, l'introduction d'une membrane délimitant deux compartiments assure uniquement le passage des molécules de faible poids moléculaire. Grâce à l'agitation appropriée de la solution et du dialysat, la diffusion se confine à la seule épaisseur de la membrane, de surface effective A . L'équation (17) devient après intégration :

$$J = - \frac{dC_i V_i}{dt} = \frac{dC_e V_e}{dt} = \frac{DA}{h} (C_i - C_e) \quad (18)$$

Les indices i et e renvoient aux compartiments intérieur (solution) et extérieur (dialysat) de la cellule de dialyse et V à leur volume respectif.

En l'absence d'un adjuvant mobilisant une partie de la substance diffusante, la vitesse instantanée est directement proportionnelle à la concentration totale $[D_t]$:

$$- \frac{d[D_t]}{dt} = k_1 [D_t] \quad (19)$$

k_1 = constante de vitesse.

Dans le cas contraire^{14,84-89}, la vitesse de transport du diffusant est uniquement fonction de sa fraction libre $[D_f]$:

$$- \frac{d[D_t]}{dt} = k_1 [D_f] \quad (20)$$

Si l'on se réfère à la concentration totale, la constante de vitesse est modifiée :

$$- \frac{d[D_t]}{dt} = k_2 [D_t] \quad (21)$$

En intégrant les équations (19) ou (21) de t_0 à t , on obtient la forme générale :

$$\ln \frac{[D_t]}{[D_0]} = - \frac{DA}{V_i h} t = - kt \quad (22)$$

Ainsi, seule la pente k diffère selon que le principe actif se trouve seul ou en présence d'un adjuvant offrant des sites d'interaction⁹⁰. La combinaison des équations (20) et (21) permet de calculer la fraction libre de la substance :

$$\frac{[D_f]}{[D_t]} = \frac{k_2}{k_1} \quad (23)$$

Cette équation équivaut à l'inverse du rapport R (cf. (6) du chapitre III.1.3).

D'autre part, la concentration totale représentant la somme des concentrations liée et libre, l'équation (21) prend la forme²⁵ :

$$-\frac{d[D_t]}{dt} = \frac{k_1[D_t]}{1 + [D_b]/[D_f]} \quad (24)$$

D'après cette expression, on remarque que le transport du principe actif, en présence de tensio-actif, ne suit une cinétique de premier ordre que si le rapport $[D_b]/[D_f]$ reste constant pendant l'expérience. Ceci peut être vérifié par la linéarité de la représentation graphique de la relation (22).

Dans le cas de la solubilisation micellaire, il est possible de rapprocher l'équation (22) de celle exprimant K'_m :

$$\frac{[D_f]}{[D_t]} = \frac{1}{K'_m[S] + 1} = \frac{k_2}{k_1} \quad (25)$$

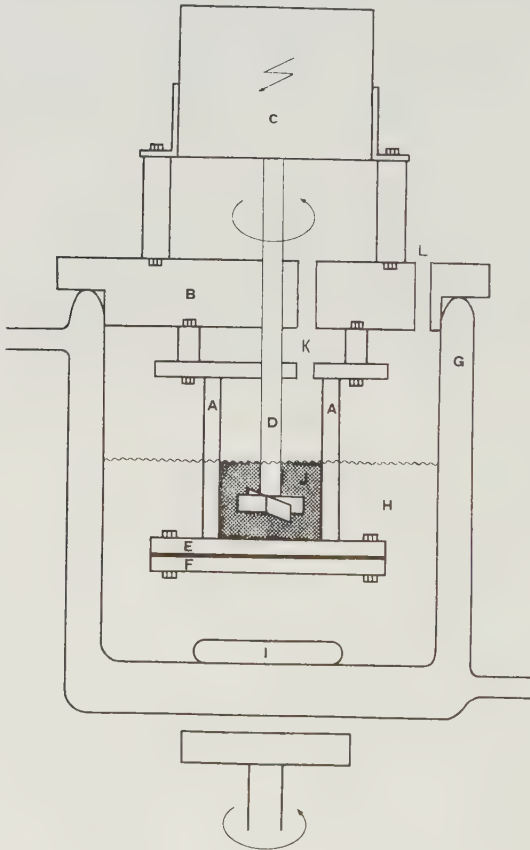
Ainsi pouvons-nous calculer la valeur du coefficient de partage apparent micelle/eau K'_m à partir des pentes des dialyses effectuées avec et sans tensio-actif.

III.4.2 Mode opératoire

Pour les expériences de dialyse dynamique, nous avons employé une cellule de diffusion mise au point dans notre laboratoire⁹¹ (fig. 14).

Figure 14

Schéma de la cellule de diffusion



La cellule proprement dite (A) en plexiglas, renfermant la solution diffusante (principe actif avec ou sans adjuvant) est vissée sur un couvercle en PVC (B). Un moteur asynchrone (C) (Crouzet, 100 tpm) fixé sur ce couvercle et muni d'un agitateur (D) à pales, assure l'agitation à l'intérieur de la cellule. La membrane de dialyse est en cellophane (type PD 215 E.I. Du Pont de Nemours), traitée selon le mode opératoire décrit par *Doelker*⁹². Elle est maintenue entre deux couronnes de plexiglas (préalablement enduites de silicone pour assurer une étanchéité totale), l'une solidaire de la cellule (E), l'autre vissée à cette dernière (F). Le couvercle est posé sur un bécher à double paroi (G) thermosatisé à la température choisie (30, 37 ou 45°) qui contient le milieu récepteur (H). Ce dernier est agité au moyen d'un barreau magnétique de 4 cm (I), à une vitesse de 300 tpm. L'appareillage se règle de façon à ce que le niveau des 20 ml de la solution diffusante à l'intérieur de la cellule (J) et celui des 300 ml du milieu récepteur coïncident.

Les solutions destinées à l'expérience sont amenées à la température désirée puis placées dans leurs compartiments respectifs. L'eau employée à leur préparation est distillée, bouillie puis refroidie. La membrane de cellophane est fixée à la cellule en évitant la formation de bulles d'air. Si toutefois ces dernières apparaissent à la surface de la membrane, elles sont éliminées par aspiration au moyen d'une seringue munie d'une aiguille recourbée.

Les 20 ml de solution dialysante sont introduits dans la cellule à l'aide d'une pipette par l'orifice (K). A cet instant, considéré comme temps zéro, les agitations des deux compartiments sont enclenchées. Généralement, quatre à six cellules sont montées en parallèle.

A intervalles réguliers, 3 ml de la solution réceptrice sont prélevés par l'orifice (L) au moyen d'une pipette. Après chaque mesure spectrophotométrique, l'échantillon est remplacé dans son compartiment.

Nous avons vérifié au préalable par une méthode fluorimétrique⁹³ que pendant la durée de l'expérience (2 h), le passage du TCNa à travers la membrane était nul. Il est donc possible d'employer, pour les mesures spectrophotométriques, une solution de compensation identique à celle placée dans le compartiment récepteur.

III.4.3 Résultats et commentaires

Comme l'ont fait plusieurs auteurs pour divers adjuvants^{13,16,22,25,41,90}, nous comparons ici l'influence du TCNa sur la variation des vitesses de dialyse. L'observation des représentations graphiques permet de connaître la nature du rapport de la concentration liée à celle libre. Une linéarité indique qu'il reste constant pendant toute l'expérience. Dans le cas inverse, l'équation de *Scatchard*¹¹ est souvent appliquée pour définir l'interaction entre le principe actif et l'adjuvant.

A l'aide d'un programme d'ordinateur, les constantes de vitesse sont déterminées selon l'équation semi-logarithmique (22). Pour tous les essais, nous avons testé l'ajustement linéaire, qui s'est révélé adéquat ($P_{0,05}$).

Les tableaux 13 pour le salicylamide et 14 pour l'acide salicylique regroupent les différentes constantes de vitesse de dialyse calculées selon l'équation (22).

Tableau 13

*Constantes de vitesse ($\text{min}^{-1} 10^{-3}$) des dialyses dynamiques
du salicylamide dans différentes conditions
(Concentration initiale de salicylamide : 18 mg/20 ml)*

Conditions	Concentration TCNa [S] / g (100 ml) ⁻¹							
	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,8
Eau; 30°	4,6031* 3,6776	3,5415*	3,5978*	4,0033	2,9543*	3,6263	2,8848*	2,5160*
Eau; 37°	5,8512* 4,5521	4,0288*	3,6086*	4,6057	4,5316*	4,1540	3,3451*	2,7908*
Eau; 45°	6,8873	6,2860	5,7794	5,4430	5,1205	5,0970	4,6917	—
pH 6,0; 37°	5,5404	5,3070	5,3418	5,1410	4,9693	4,8623	4,8579	—
pH 2,2; 37°	5,6781	5,5573	5,6559	5,4090	5,3698	5,1808	5,0040	—

* Essais effectués avec une membrane d'un lot de perméabilité inférieure.

Tableau 14

*Constantes de vitesse ($\text{min}^{-1} 10^{-3}$) des dialyses dynamiques
de l'acide salicylique dans différentes conditions
(Concentration initiale d'acide salicylique : 18 mg/20 ml)*

Conditions	Concentration TCNa $[\text{S}] / \text{g (100 ml)}^{-1}$					
	0,0	0,2	0,4	0,8	1,2	1,8
pH 2,2; 30°	3,3875 *	3,5868 *	3,4962 *	2,8784 *	2,8474 *	2,4390 *
pH 2,2; 37°	4,4403 *	3,3872 *	3,8328 *	3,6270 *	3,4004 *	—

* Voir tableau 13.

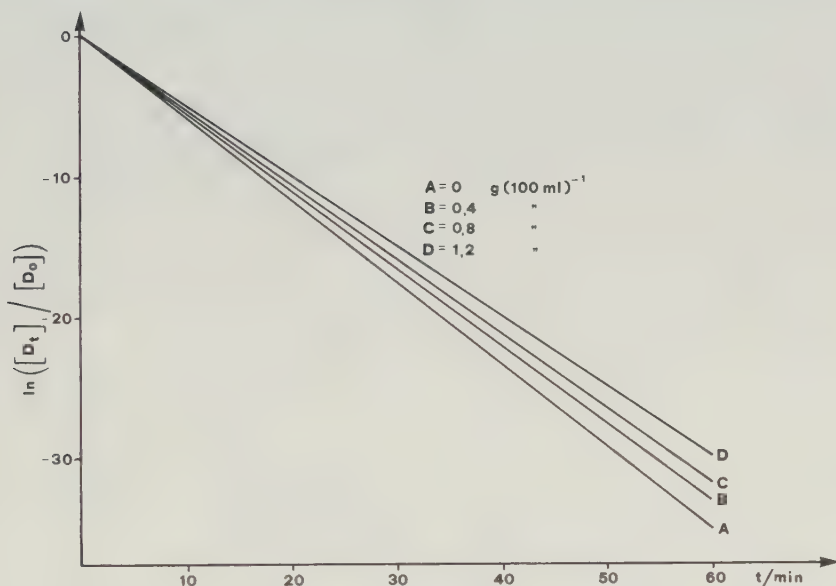
L'élévation de la température provoque pour les deux dérivés une accélération du transport (augmentation de la constante de vitesse). Pour le salicylamide, les dialyses sont plus rapides en milieu de pH 2,2 que dans celui de pH 6,0. En effet, ceci est dû au meilleur passage à travers ce type de membrane des molécules non dissociées, dont le degré de solvation est plus faible⁹⁴.

Nous présentons graphiquement un exemple de dialyse dynamique pour une seule condition de température et de milieu, mais avec différentes concentrations de TCNa; ceci permet de montrer la linéarité de la représentation

semi-logarithmique ainsi que la diminution de la constante de vitesse de dialyse en présence de concentrations croissantes de sel biliaire.

Figure 15

*Dialyse dynamique du salicylamide en présence de
différentes concentrations de TCNa
(pH 2,2; 37°)*



La présence de TCNa induit un ralentissement du transport, surtout au-delà de la C.M.C.. Pour l'acide salicylique, le comportement aux valeurs proches de la C.M.C. est particulier; on observe même une amélioration du passage pour des concentrations de TCNa de 0,2 et 0,4 g/100 ml à 30°.

Afin de caractériser la capacité de liaison dans les différentes conditions, nous portons l'inverse de l'équation (25), c'est-à-dire le rapport des constantes de vitesse

de dialyse sans et avec adjuvant, en fonction de la concentration de ce dernier. Cette droite est une représentation de l'équation (6), dont la pente k , passant par l'unité, correspond à K'_m . Les valeurs de ces pentes et leur coefficient de corrélation sont regroupés dans le tableau 15. En parallèle figurent également les valeurs de r , rapport molaire de la quantité liée et de la quantité de sel biliaire.

Tableau 15

Paramètres de capacité de liaison des deux principes actifs

Conditions	$k/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	r^2	$r = [D_m] / [S]$
S A L I C Y L A M I D E			
Eau; 30°	0,014	0,979	0,066
Eau; 37°	0,020	0,968	0,087
Eau; 45°	0,021	0,991	0,102
pH 6,0; 37°	0,007	0,984	0,041
pH 2,2; 37°	0,005	0,940	0,030
A C I D E S A L I C Y L I Q U E			
pH 2,2; 30°	0,011	0,985	0,054
pH 2,2 37°	0,015	0,983	0,075

Nous remarquons que le rapport r augmente avec la température pour les deux dérivés; il est plus élevé pour l'acide salicylique que pour le salicylamide. D'autre part, pour ce dernier, la quantité incorporée dans les micelles est plus importante dans l'eau et le tampon de pH 6,0 que dans celui de pH 2,2. Ces constatations sont en accord avec celles établies avec les autres méthodes. La variation de K'_m ainsi déterminé est due à la modification du degré de saturation en fonction de la température⁴⁴.

Comme pour la dialyse à l'équilibre, nous interprétons les résultats selon l'isotherme de *Freundlich* (fig.16 et 17).

Figure 16

Isothermes de Freundlich du salicylamide à trois températures
(Concentration initiale du principe actif :
 $6,55 \text{ mmol dm}^{-3}$; $[S] = 22,32 \text{ mmol dm}^{-3}$)

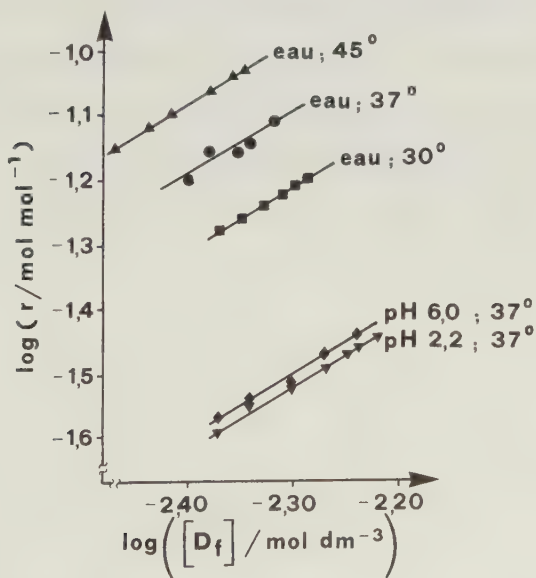
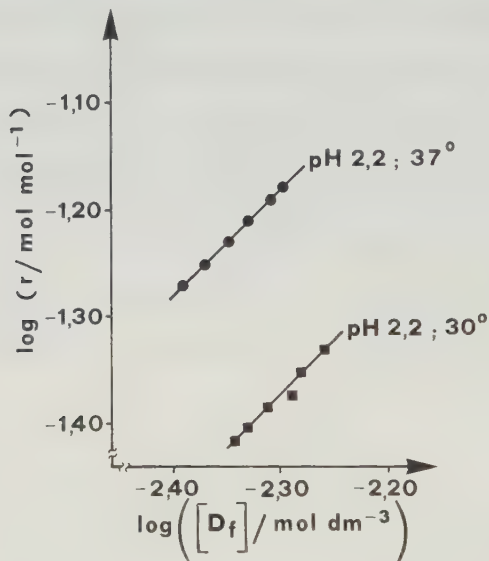


Figure 17

Isothermes de Freundlich de l'acide salicylique à deux températures
(Concentration initiale du principe actif:
 $6,52 \text{ mmol dm}^{-3}$; $[S] = 22,32 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Cette interprétation est souvent utilisée dans les expériences de dialyse dynamique afin de caractériser l'interaction principe actif/adjuvant. Dans les diverses conditions étudiées, les pentes des droites sont voisines de l'unité. Ceci confirme la notion de partage déjà constatée pour l'autre type de dialyse.

III.4.4 Analyse des résultats par régression multiple

Afin d'évaluer l'importance des différents facteurs étudiés, nous recourons à une analyse de régression multiple du type "Stepwise"⁹⁵. Cette méthode signifie qu'à chaque pas

de la régression une nouvelle variable est ⁱintroduite dans l'équation. A chaque fois, la variable retenue est celle qui apporte la plus grande diminution des carrés des écarts entre les valeurs observées et prédites. Cela équivaut au plus grand facteur de corrélation partielle avec la variable dépendante. Nous essayons de trouver, à l'aide d'un modèle, les termes d'une équation exprimant l'influence de chaque facteur, à savoir : temps, concentration de TCNa, température ou milieu. Le modèle retenu est un polynôme du second degré, du type

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (26)$$

y = variable dépendante

b₀ = terme constant

b₁, b₂, b₃ = coefficients des termes linéaires

b₁₁, b₂₂, b₃₃ = " " " quadratiques.

Les modèles avec des termes représentant les interactions ont été abandonnés car ils n'apportaient aucune amélioration de l'ajustement.

La valeur mesurable y correspond à $\ln \left[\frac{D_t}{D_o} \right]$,
calculé selon l'équation (22) à chaque temps (valeur moyenne).

Les différentes variables introduites sont :

x_1 = temps (de 0 à 60 min)

x_2 = concentration de TCNa (de 0 à 1,8 g/100 ml)

x_3 = milieu (pH 2,2 et 6,0)

x'_3 = température (30, 37 et 45°)

Les calculs ont été effectués sur ordinateur
Univac 1108 du Centre Cantonal Genevois d'Informatique
(programme SPSS).

Le tableau 16 regroupe les valeurs obtenues pour
chaque terme avec la valeur de F et mentionne le coefficient
de corrélation du modèle. Seules les expériences effectuées
avec un même lot de membranes ont été retenues pour une même
analyse. De plus, un graphique combiné pour chaque régression
permet de visualiser l'importance et le sens de la contribution
des facteurs, à l'exception du temps (fig. 18).

Tableau 16

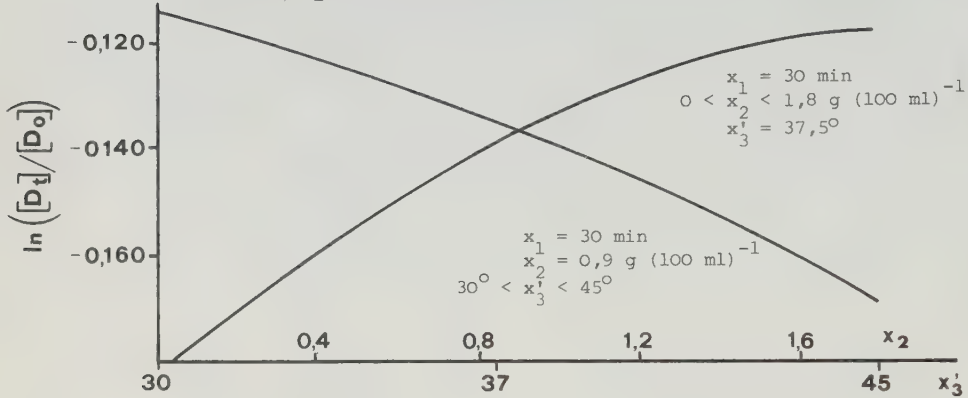
Résultats des analyses par régression multiple

Variables	Coefficients	Valeurs de F
S A L I C Y L A M I D E dans l'eau x_1 = temps; x_2 = conc. TCNa; x_3' = température terme constant $b_0 = -0,01393$ ($r^2 = 0,96973$)		
x_1	-0,00523	96,718
x_2	0,06515	10,457
x_3	0,00308	0,151
x_3^2	0,00009	0,676
S A L I C Y L A M I D E à 37° x_1 = temps; x_2 = conc. TCNa; x_3 = milieu terme constant $b_0 = -0,02287$ ($r^2 = 0,99645$)		
x_1	-0,00507	836,020
x_2	0,03022	19,140
x_3	0,00106	6,846
x_2^2	-0,00747	1,825
A C I D E S A L I C Y L I Q U E dans pH 2,2 x_1 = temps; x_2 = conc. TCNa; x_3' = température terme constant $b_0 = 0,03912$ ($r^2 = 0,96123$)		
x_1	-0,00342	1399,408
x_2	0,01960	3,872
x_3	-0,00155	10,081
x_2^2	-0,00107	0,032

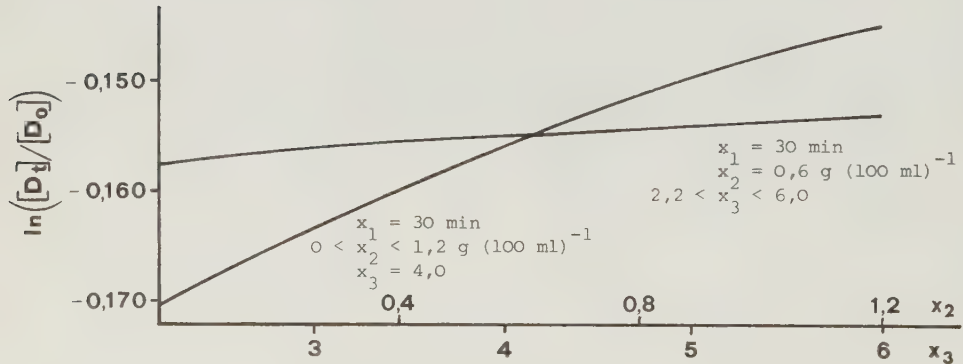
Figure 18

Courbes combinées de l'analyse de régression multiple

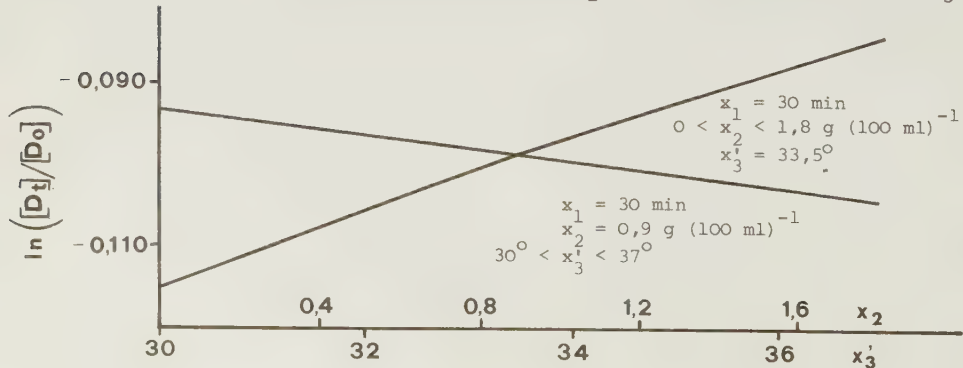
a) Salicylamide dans l'eau, influence de la concentration de TCNa (x_2) et de la température (x_3)



b) Salicylamide dans les milieux tampons à 37°, influence de la concentration TCNa (x_2) et du pH du milieu (x_3)



c) Acide salicylique dans le tampon pH 2,2, influence de la concentration TCNa (x_2) et de la température (x_3)



Si nous analysons l'importance relative des variables, on remarque que les coefficients du temps sont les plus élevés. La différence existant entre les deux lots de membranes est mis en évidence par les valeurs de ces coefficients.

L'examen des paramètres b_2 indique que la concentration de sel biliaire joue un rôle plus important pour les expériences effectuées dans l'eau que pour celles réalisées dans les solutions tampons.

L'élévation du pH provoque un ralentissement du transport. Cette constatation rejoint d'ailleurs les informations apportées par les autres méthodes, montrant une solubilisation micellaire plus forte à pH 6,0.

Enfin, la température joue un rôle plus marqué avec l'eau qu'avec les tampons.

III.5 Conclusions de l'étude in vitro

En premier lieu, il est intéressant de comparer les trois méthodes choisies et les renseignements qu'elles fournissent. Lorsque nous examinons les résultats obtenus pour des concentrations fixes de principe actif mais variables de sel biliaire, nous remarquons que le paramètre K'_m déterminé par la méthode de la solubilité est généralement plus faible qu'avec les dialyses. Ceci résulte des variations du degré de saturation de la phase aqueuse en principe actif libre⁴⁴.

Pour les dialyses, lorsque le TCNa est en concentration constante et que celle du principe actif varie, la correspondance des méthodes est satisfaisante. Afin de mettre

en évidence cette concordance, nous avons procédé à une combinaison des résultats^{89,96-97} des deux techniques de dialyse pour des conditions identiques et traitées selon l'isotherme de *Langmuir* (10). Les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,95 et les valeurs de K'_m sont légèrement plus élevées que celles issues de la méthode de la solubilité.

Concernant les différents facteurs traités, leur influence sur la répartition des deux dérivés entre les phases micellaire et aqueuse est discutée séparément.

Influence du milieu

La solubilisation micellaire est plus importante pour le milieu voisin de la neutralité ou pour l'eau que pour le milieu acide, comme l'a montré l'étude avec le salicylamide. Une diminution de la capacité de solubilisation micellaire des sels biliaires due aux électrolytes a été également mise en évidence par *Martis, Holl et Takkar*⁹⁸ pour le glycocholate de sodium et la testostérone.

La comparaison des deux milieux tampons indique que le salicylamide a une affinité plus marquée pour les micelles en milieu neutre. Il est possible d'attribuer ce phénomène à la C.M.C. plus basse à ce pH qu'à celui de 2,2, d'où une proportion plus élevée de molécules à l'état micellaire. Il est également à noter qu'à pH 2,2, près de la moitié du sel biliaire se trouve sous forme acide.

D'autres expériences⁵⁹ effectuées avec le salicylamide et des tensio-actifs non ioniques n'ont pas montré d'influence marquée du pH sur la quantité incorporée dans les micelles.

Influence de la température

L'élévation de la température entraîne une augmentation de la quantité liée par le tensio-actif, pour les deux substances examinées et pour les trois méthodes. Cette observation est en accord avec les constatations générales de plusieurs auteurs^{99,100} ainsi qu'avec les essais de *Bates, Gibaldi* et *Kanig*¹⁴ effectués avec différents sels biliaires.

Que le milieu soit saturé ou non en principe actif, l'effet de la température n'est pas identique sur le paramètre K'_m quand la concentration de TCNa varie. Ainsi, dans la méthode de solubilité, la valeur caractéristique diminue avec une augmentation de température, alors que dans les dialyses, son élévation provoque une diminution du degré de saturation, d'où une augmentation de K'_m .

Le calcul des paramètres thermodynamiques sur la base des valeurs de K'_m obtenues à saturation apporte une appréciation quantitative des énergies impliquées dans le processus de solubilisation micellaire. Ce calcul est effectué de façon conventionnelle (tabl. 17).

La variation de l'énergie libre du système ΔH ou chaleur de partage est obtenue à partir de la pente de la droite

répondant à l'équation :

$$\ln K'_m = - \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (27)$$

où R = constante des gaz

T = température absolue.

La variation de l'enthalpie ΔG résulte de :

$$\Delta G = - RT \ln K'_m \quad (28)$$

Enfin, la variation de l'entropie ΔS du système est obtenue par l'expression :

$$T\Delta S = \Delta H - \Delta G \quad (29)$$

Tableau 17

*Paramètres thermodynamiques de la solubilisation micellaire
du salicylamide dans l'eau*

Température/°	$K'_m/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\Delta G/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta S/\text{kJ K mol}^{-1}$
30	13,1	-6,47	-12,58	-6,10
37	12,1	-6,42		-6,16
45	10,3	-6,16		-6,42

La valeur négative de la variation de l'énergie libre du système prouve que le phénomène de solubilisation micellaire est exothermique^{32,58,101}. L'incorporation micellaire d'une fraction du principe actif est attestée par une entropie négative¹³. Des conclusions identiques sur les signes et les ordres de grandeur des paramètres peuvent être tirées des expériences réalisées avec l'acide salicylique aux températures de 30 et 37°.

Influence de la concentration de TCNa

Le taurocholate joue un rôle sur le transport du principe actif. Le ralentissement est proportionnel à la concentration de sel biliaire, qui détermine l'importance de la phase micellaire et de la quantité incorporée. Ces observations recourent celles faites avec d'autres agents non physiologiques. Les travaux de *Lovering* et *Black*³⁸ comparant le cholate à des tensio-actifs des trois types, confirment cette similitude.

IV. Influence du TCNa sur l'absorption des principes actifs chez le rat

Dans la première partie de ce travail, différentes méthodes d'étude *in vitro* ont mis en évidence le partage de deux dérivés entre les phases micellaire et aqueuse.

Nous avons remarqué que le TCNa pouvait ralentir le passage de l'acide salicylique et du salicylamide à travers diverses membranes artificielles, lors des dialyses. Il est donc intéressant de savoir quelle est son action *in vivo*.

Dans cette seconde partie, nous envisageons l'influence de ce partage sur le transport de ces deux substances à travers la paroi intestinale du rat. En effet, Collet, Withington et Cox¹⁰² comparant *in vivo* et *in vitro* le transfert de l'acide salicylique en présence de polysorbate à travers diverses membranes, ont montré que le phénomène est plus complexe *in vivo* en raison des nombreux facteurs impliqués.

IV.1 Absorption de substances médicamenteuses chez l'animal

IV.1.1 Généralités et méthodes d'investigation

Dans une revue, *Pfleger*¹⁰³ examine les différentes techniques utilisant des animaux comme modèles d'étude de l'absorption des médicaments. Elles sont nombreuses et variées. Nous examinerons plus particulièrement celles de la *boucle intestinale* du rat, qui consiste à mesurer l'absorption par un segment déterminé. Elle peut s'appliquer à l'animal anesthésié ou non et présente l'avantage de respecter l'irrigation sanguine de la muqueuse¹⁰⁴, contrairement à la technique du *sac éversé*, très largement employée par de nombreux chercheurs¹⁰⁵⁻¹¹². Elle permet l'investigation au niveau de l'intestin grêle, indépendamment de l'estomac; notons que l'inverse est parfois pratiqué. Il est également possible d'éviter ou au contraire d'analyser l'interférence hépatique, ainsi que de comparer les propriétés de différentes sections du tube digestif¹¹³.

Dans ce travail, nous adoptons la méthode de la boucle intestinale avec *canulation*, méthode décrite par *Doluisio et coll.*¹¹⁴. Elle est facilement réalisable et permet de nombreux prélèvements; les paramètres cinétiques obtenus ne varient que peu d'un animal à l'autre et les vitesses d'absorption sont réalistes.

Il nous a toutefois paru intéressant de doser également les substances dans le sang, afin d'établir des relations entre leur disparition du lumen intestinal et leur apparition

dans le torrent circulatoire. Différentes techniques sont utilisées pour obtenir des échantillons sanguins chez le rat : prises dans la queue¹¹⁵, au niveau de l'oeil¹¹⁶, dans les veines cave^{117,118}, porte¹¹⁹ ou jugulaire¹²⁰, ainsi que par ponction cardiaque¹²¹.

Nous avons retenu la méthode du prélèvement dans le sinus caverneux de l'oeil¹¹⁶, car elle est facile, offre la possibilité de prises répétées et rapides et n'implique pas le sacrifice de l'animal.

D'autres techniques sont également adoptées pour mettre en évidence l'action de tensio-actifs physiologiques ou synthétiques sur l'absorption. La peau du poisson rouge, en raison de sa grande similitude avec la paroi intestinale, est un modèle largement utilisé¹²²⁻¹²⁴. D'autres auteurs ont recours à la voie rectale^{51,125,126} ou intramusculaire chez le rat¹²¹.

Enfin, Gouda, Khalil et Khalafallah^{127,128} étudient, chez l'homme, l'influence du désoxycholate et du sulfosuccinate de sodium sur l'absorption intestinale de principes actifs peu solubles.

IV.1.2 *Revue de la littérature*

Le tableau 18 regroupe différents essais réalisés sur l'animal dans le but d'observer l'influence d'adjuvants sur les phénomènes d'absorption.

Tableau 18

*Travaux relatifs à l'influence des adjuvants sur l'absorption
in situ de substances médicamenteuses chez l'animal*

Adjuvants	Principes actifs	Animal; techniques	Réf.
Polysorbate 80, acide oléique	Acide salicylique, salicylamide, 4-aminoantipyrine	Rat; canulation de l'intestin grêle	129
Polysorbate 80	Acide salicylique	Rat; canulation de l'intestin grêle	130
Polysorbate 80	Salicylamide	Rat; perfusion avec circulation dans l'intestin grêle	28
Polysorbate 80, hexadécane, alcool oléique	Sulfonamide, dicoumarol, griséofulvine	Rat; ponction cardiaque	131
Polysorbate 80	Sécobarbital	Poisson rouge; immersion	122
Polysorbate 80	4-Aminoantipyrine	Poisson rouge; immersion	123
Polysorbate 20	Acide salicylique	Rat; canulation de l'estomac	102
Polysorbate 80, glycocholate-Na, laurylsulfate-Na	Disulfide de thiamine	Rat; perfusion intestinale	132
Polysorbate 80, divers éthers et esters polyoxy- éthyléniques	Thioridazine	Poisson rouge; immersion	133

Tableau 18 (suite)

Adjuvants	Principes actifs	Animal; techniques	Réf.
Diocylsulfosuccinate-Na, poloxamère 188	Sulfadiazine, acétylsulfisoxazole	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	134
Diocylsulfosuccinate-Na, poloxalène	Phénolphtaléine	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	135
Diocylsulfosuccinate-Na	Pentobarbital	Rat; perfusion intestinale	136
Diocylsulfosuccinate-Na, poloxalène	Pentobarbital	Poisson rouge; immersion	124
Taurocholate-Na	Catéchine	Rat; canulation de l'intestin grêle, ponction cardiaque	137
Taurodéoxycholate-Na	Aminoantipyrine	Poisson rouge; immersion	138
Taurocholate-Na, glycocholate-Na	Sulfaguanidine	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	139
Glycocholate-Na	Bromure de décaméthonium	Rat; boucle intestinale, mesure du temps jusqu'à la mort	140
Glycocholate-Na, taurocholate-Na	Phénolphtaléine, sulfanilamide, sulfaguanidine, aloclamide	Rat; perfusion intestinale, mesure en fin d'expérience	141

Tableau 18 (suite)

Adjuvants	Principes actifs	Animal; techniques	Réf.
Déoxycholate-Na	Phénolphtaléine	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	106
Glycocholate-Na	Iodure d'isopropanamide, ammoniums quaternaires	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	142
Déhydrocholate-Na, bile	Sulfadiazine	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	143
Taurodéoxycholate-Na, déhydrocholate-Na, chénodésoxycholate-Na, cholate-Na	Sécobarbital	Poisson rouge; immersion	144
Bile	Noréthistérone, acétate de chlormadinone	Rat; canulation de l'intestin grêle, canulation de la veine porte	119 145
Bile	Méthylbromure d'octatropine	Rat; boucle intestinale, mesure après sacrifice	113
Bile	Bromure de dextro-méthorphane	Rat; canulation de l'intestin grêle, ponction cardiaque	146
Dérivés du propanamide	Prednisone, prednisolone	Rat; canulation de l'intestin grêle	147

Tableau 18 (suite)

Adjuvants	Principes actifs	Animal; techniques	Réf.
Dérivés du propanamide	Barbital acide salicylurique, acide p-aminohippurique, riboflavine, tétracycline, phénolphtaléine, paracétamol	Rat; canulation de l'intestin grêle	148
Dérivés du propanamide	Prednisolone	Rat; perfusion avec circulation dans l'intestin grêle	149
Dérivés du propanamide	Prednisolone	Rat; canulation de l'intestin grêle	107
Propylèneglycol	Warfarine	Rat; canulation de l'intestin grêle, ponction cardiaque	150
Ethanol	Théophylline	Rat; canulation de l'intestin grêle, prises de sang dans l'aorte	151
Aspirine	Paracétamol	Rat; prises de sang dans la queue	115
Tocophérol	Barbital, phénolphtaléine, divers salicylates	Rat; prises de sang dans la queue	152
Chlorhydrate de colestipol	Aspirine, tyrosine, phénobarbital, cortisone, sulfadiazine	Rat; prises de sang dans la veine jugulaire	153

IV.2 Estimation de l'absorption

IV.2.1 Méthode d'évaluation de l'absorption intestinale *in situ*

Nous pratiquons la méthode de la boucle intestinale décrite par *Doluisio*¹¹⁴, avec un certain nombre de modifications afin de normaliser les essais.

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles Wistar de 200 à 280 g, maintenus dans des conditions standard d'alimentation et d'habitat. Ils sont mis à jeun 16 à 20 heures avant l'intervention¹⁵⁴, mais reçoivent de l'eau *ad libitum*. Pendant leur jeûne, ils sont enfermés dans des cages, munies en leur fond d'une grille afin d'éviter la coprophagie¹³⁷.

Chaque animal est anesthésié par une injection intrapéritonéale d'uréthane, à raison de 1 mg/g de poids corporel. Pendant toute la durée de l'expérience, la température du rat est maintenue à 35° grâce à un coussin électrique.

La technique chirurgicale et la pose des canules sont identiques à la description de *Crevoisier*¹³⁷. La lumière intestinale est lavée avec 700 ml d'une solution de perfusion à 37°, au moyen d'une pompe péristaltique réglable (Guldener Vario Perpex II) qui permet d'augmenter progressivement le débit jusqu'à 75 ml/min. Puis la solution de perfusion est chassée en insufflant de l'air avec la pompe pendant 8 minutes, à un réglage correspondant à un débit d'environ 30 ml/min. Afin d'éliminer les éventuels restes de cette solution et sans modifier le réglage de la pompe, l'intestin est rincé deux fois pendant 4

minutes avec 3,5 ml de la solution contenant les substances à tester. Ensuite, les canules duodénale et iléale sont reliées par des tuyaux de polyéthylène de 3 cm à deux seringues en verre de 20 ml, munies d'un robinet à trois voies. Les 12 ml de solution à tester, préalablement tempérés à 37⁰, sont introduits dans la lumière intestinale par la seringue duodénale jusqu'à ce que le liquide apparaisse dans la canule iléale. A ce moment, le chronomètre est enclenché et l'on prélève 2 ml de la solution qui sont dosés, donnant la concentration au temps zéro. Ce prélèvement de 2 ml se justifie par l'excès que représentent les 12 ml de départ, susceptible de provoquer un gonflement anormal du segment. Un laps de temps de cinq minutes est toujours fixé entre le deuxième rinçage et le début de l'expérience.

Les prélèvements suivants (0,1 ml) sont effectués alternativement dans les deux seringues, en poussant la solution avec le piston de la seringue opposée pour assurer un mouvement du liquide le long de l'intestin. En fin d'expérience, le segment intestinal situé entre les deux canules est excisé pour en mesurer sa longueur (70 à 100 cm).

IV.2.2 Méthode de prélèvements sanguins

On prélève le sang dans le sinus caverneux de l'oeil¹¹⁶ au moyen de capillaires imprégnés d'une solution héparinisée puis séchés sous vide. On perfore la paroi de la veine, le sang monte dans le capillaire, puis on le transvase dans de petits tubes de PVC héparinisés d'une capacité de 200 µl, que

l'on agite immédiatement afin d'éviter la formation de caillot. Pour permettre le dosage, le volume des prises de sang pratiquées tour à tour dans chaque oeil doit être voisin de 50 μ l.

IV.2.3 Préparation des solutions

La solution de perfusion utilisée pour le lavage de l'intestin est identique à celle de *Doluisio* et coll.¹¹⁴ (NaCl $1,45 \times 10^{-1}$ M, KCl $4,56 \times 10^{-3}$ M, CaCl₂ $1,25 \times 10^{-3}$ M et NaH₂PO₄ $5,00 \times 10^{-3}$ M).

Le principe actif, marqué au ¹⁴C est dissous dans un tampon phosphates de pH 6,0 selon *Sørensen* à une concentration de 2 mg/ml, correspondant à une activité de 0,25 μ Ci/ml. Pour les expériences relatives au transport du TCNa, c'est ce dernier qui est marqué au ¹⁴C (0,25 μ Ci/ml) et non le principe actif.

La solution contient également un traceur non absorbé, l'inuline tritiée (0,375 μ Ci/ml), pour permettre la détermination du volume de la solution dans l'intestin¹⁵⁵. La solution est rendue isotonique par l'adjonction de NaCl à des concentrations appropriées.

A noter que le plus souvent, on recourt au rouge de phénol comme élément marqueur du changement de volume de la solution^{114,132,136,137}. Dans nos expériences, ce colorant a dû être abandonné car son absorption est modifiée en présence de tensio-actif^{106,135,141}.

IV.2.4 Dosages des échantillons

Des courbes de "quenching" sont établies pour les deux isotopes et les solvants de scintillation utilisés. L'efficacité des comptages peut ainsi être calculée par la méthode du standard externe pour chaque échantillon et chaque isotope, ce qui permet de déterminer la radioactivité de chacun des prélèvements^{156,157}.

IV.2.4.1 Dosage dans le lumen intestinal

Les prélèvements de 0,1 ml sont effectués après 0,5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 et 60 minutes. Ils sont conservés dans des tubes de verre de 0,5 ml jusqu'à la fin de l'expérience. Pour le dosage, 40 µl sont prélevés et introduits dans des flacons à scintillation en polyéthylène contenant 10 ml du solvant suivant :

diphényl-2,5-oxazole	0,08 g
p-phénylènebis(phényl-5-oxazole)-2,2'	8,00 g
naphtalène	100,00 g
dioxane ad	1000 ml

On ajoute à cette solution 4% de Cab-O-Sil^R comme gélifiant.

Les comptages sont effectués sur un compteur TRI/CARB 2425 Packard (position $^3\text{H}/^{14}\text{C}$, AUTO.STAND., 2 cycles de 2 comptages de 10 min).

IV.2.4.2 Dosage dans le sang

Environ 50 μ l du sang prélevés après 0, 3, 8, 12, 18, 25, 35, 45, 55 et 60 minutes sont introduits dans des flacons à scintillation en verre.

Une quantité d'agent de solubilisation (Soluène^R-100 Packard) correspondant à 10 fois le volume de sang introduit, est déposée dans le flacon. Le mélange est homogénéisé puis laissé au repos au moins 30 minutes. On ajoute ensuite 0,5 ml d'une solution de peroxyde de benzoyle à 12,5% dans le toluène, déshydratée avec du chlorure de calcium, filtrée et conservée au frigo. Elle doit être préparée au minimum un jour à l'avance. Le mélange est agité doucement, laissé au repos pendant 10 minutes sans bouchon puis agité. Enfin, on complète avec 10 ml de solvant de scintillation :

p-phénylènebis(phényl-5-oxazole)-2,2'	4,00 g
diphényl-2,5-oxazole	0,05 g
toluène	ad 1000 ml

Les flacons sont agités vigoureusement et abandonnés à l'abri de la lumière pendant au moins 4 heures, avant de procéder à leur comptage (MODE 1L $\rightarrow$ U; AUTO.STD.; LOWER LEVEL 0; UPPER LEVEL 1000; GAIN 650; 2 cycles de 2 comptages de 10 min).

IV.2.5 Résultats et commentaires

La vitesse relative d'absorption des deux dérivés est calculée à partir de la diminution de la concentration intestinale¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, en ayant soin de tenir compte des corrections de volume. L'équation (30) permet le calcul du pourcentage de substance non absorbé :

$$\% \text{ non absorbé} = \frac{A}{A_0} \cdot \frac{I_0}{I} \cdot 100 \quad (30)$$

A = concentration de la substance au temps t
(nombre de DPM dû au ¹⁴C dans le prélèvement de 40 µl)

A₀ = concentration de la substance au temps t₀
(nombre de DPM dû au ¹⁴C dans le prélèvement de 40 µl)

I = concentration de l'inuline au temps t
(nombre de DPM dû au ³H dans le prélèvement de 40 µl)

I₀ = concentration de l'inuline au temps t₀
(nombre de DPM dû au ³H dans le prélèvement de 40 µl)

Le pourcentage absorbé est obtenu par différence.

L'apparition des dérivés dans le sang est calculée à partir des dosages sanguins. Le nombre de DPM mesuré dans chaque échantillon de sang est rapporté à 1 ml puis exprimé en quantité de substance absorbée. Finalement, on calcule le rapport de cette valeur et de la quantité totale de substance

introduite (calculée elle-même à partir de la concentration mesurée au temps t_0 dans le lumen), afin d'obtenir le pourcentage de produit retrouvé par ml de sang. Il est également possible d'estimer le volume sanguin total de l'animal à 15 ml et d'indiquer le pourcentage passé dans la totalité du sang.

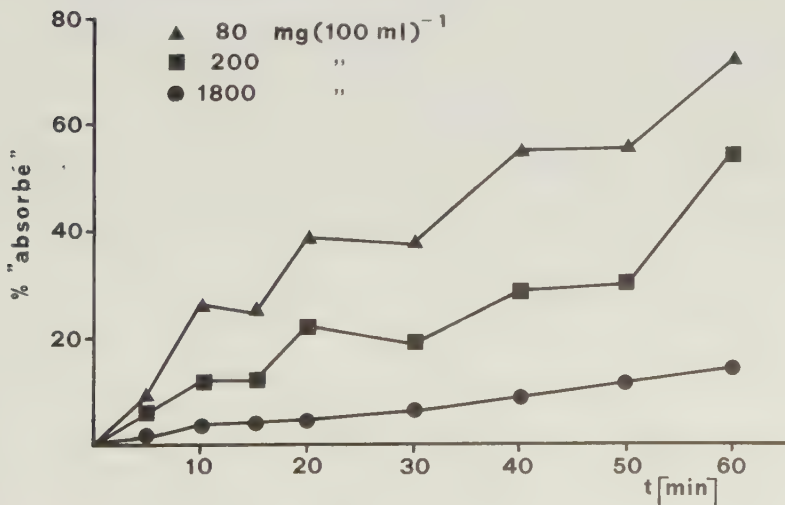
Chaque résultat correspond à la moyenne de 3 essais.

IV.2.5.1 Absorption du TCNa

L'absorption de sel biliaire (fig. 19) est suivie, en présence de principe actif, à trois concentrations différentes, soit 80, 200 et 1800 mg/100 ml. Nous avons vérifié que les résultats étaient les mêmes avec et sans la substance médicamenteuse.

Figure 19

Absorption intestinale du TCNa en présence d'acide salicylique (200 mg/100 ml), estimée par mesure de la concentration dans le lumen intestinal



Nous remarquons que le pourcentage absorbé est beaucoup plus important pour la concentration la plus basse (80 mg/100 ml). La formation de micelles explique probablement la diminution relative de l'absorption.

Par contre, les dosages sanguins indiquent que le sel biliaire ne se retrouve qu'en très faible proportion dans le sang (par exemple 0,5% pour la concentration de 80 mg/100 ml), en raison probablement de son rapide retour dans les voies hépatobiliaires ou d'un processus métabolique intervenant au niveau de la chaîne latérale du TCNa.

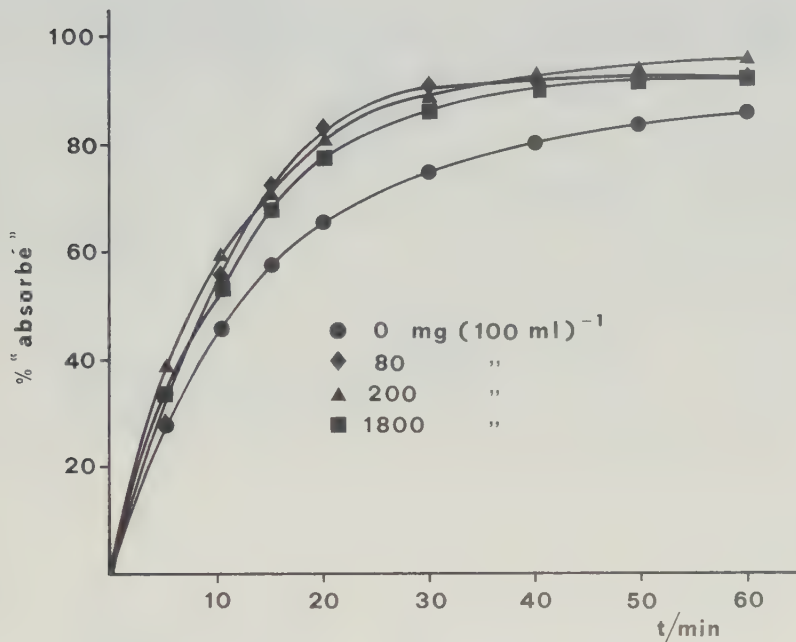
Précisons que chaque résultat est la moyenne d'au moins 3 essais.

IV.2.5.2 Influence du TCNa sur l'absorption des deux dérivés

La figure 20 montre les résultats de l'absorption intestinale de l'acide salicylique en présence de trois concentrations différentes de TCNa. Le sel biliaire favorise le passage du principe actif. Cependant, cette technique, qui consiste à mesurer la disparition de la substance du lumen intestinal, ne permet pas de mettre en évidence une différence vraiment significative entre les trois concentrations de TCNa.

Figure 20

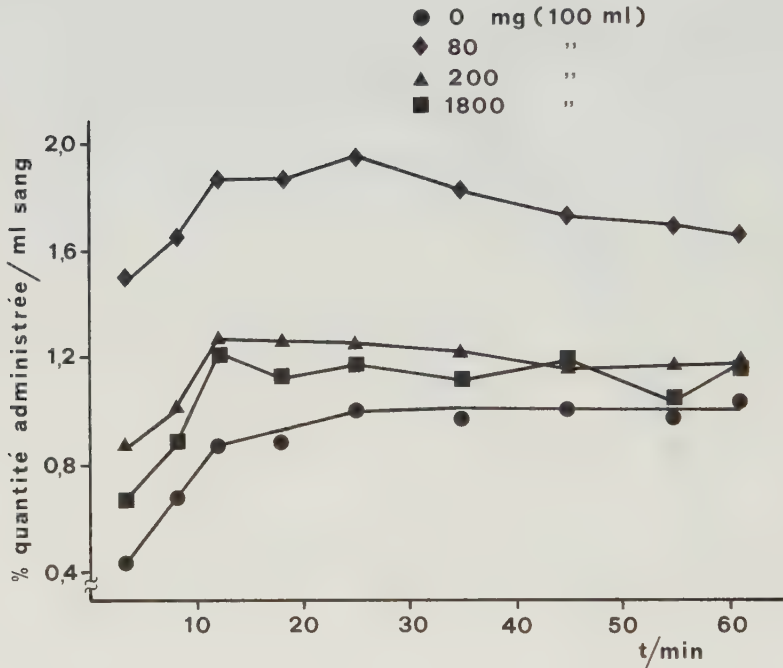
*Absorption intestinale de l'acide salicylique (200 mg/100 ml)
en présence de TCNa, estimée par mesure de la concentration
dans le lumen intestinal*



En revanche, les taux sanguins (fig. 21) font apparaître également une différence entre les concentrations, surtout dans la partie initiale. Les concentrations voisines ou inférieures à la C.M.C. manifestent une action plus prononcée que la concentration élevée, riche en micelles.

Figure 21

*Influence du TCNa sur les taux sanguins d'acide
salicylique*



Pour le salicylamide, l'action du sel biliaire présente une même tendance, mais moins marquée. D'autre part, il semble difficile de tirer des conclusions sur le rôle de sa concentration, que les mesures soient effectuées dans le lumen intestinal (fig. 22) ou dans le sang (fig. 23).

Figure 22

Absorption intestinale du salicylamide (200 mg/100 ml)
en présence de TCNa, estimée par mesure de la
concentration dans le lumen intestinal

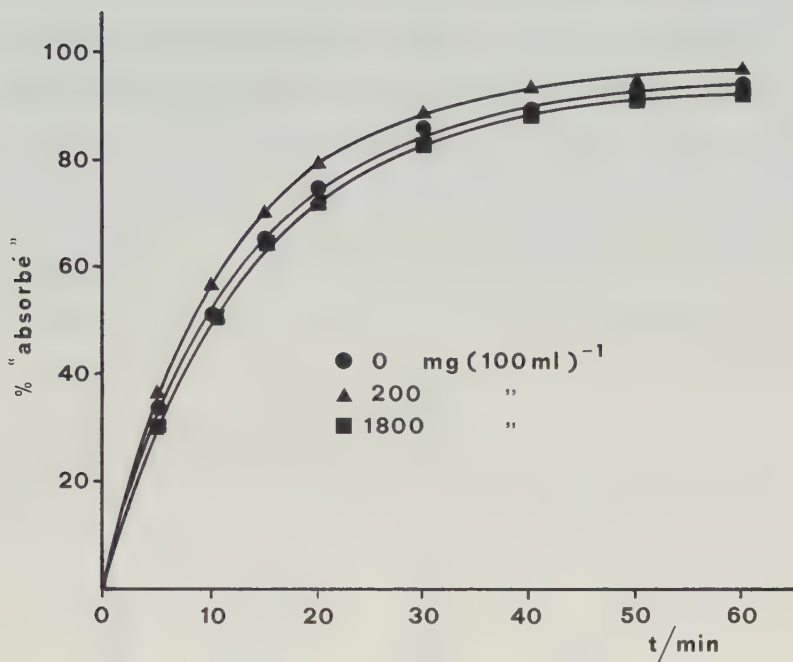
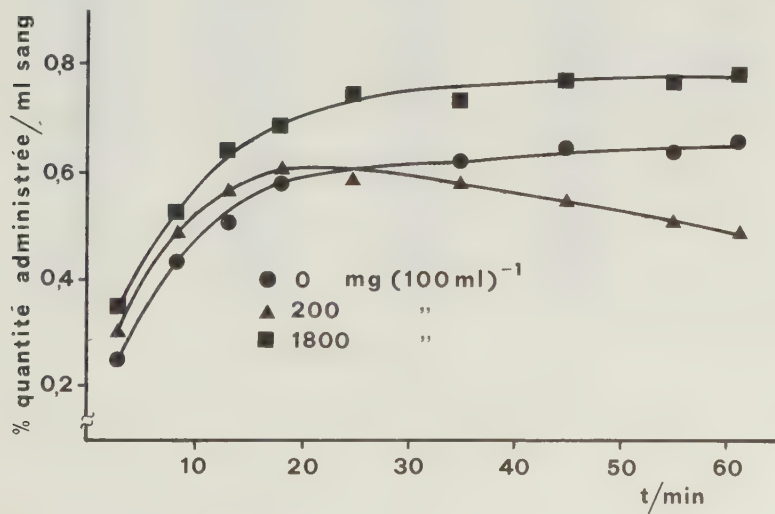


Figure 23

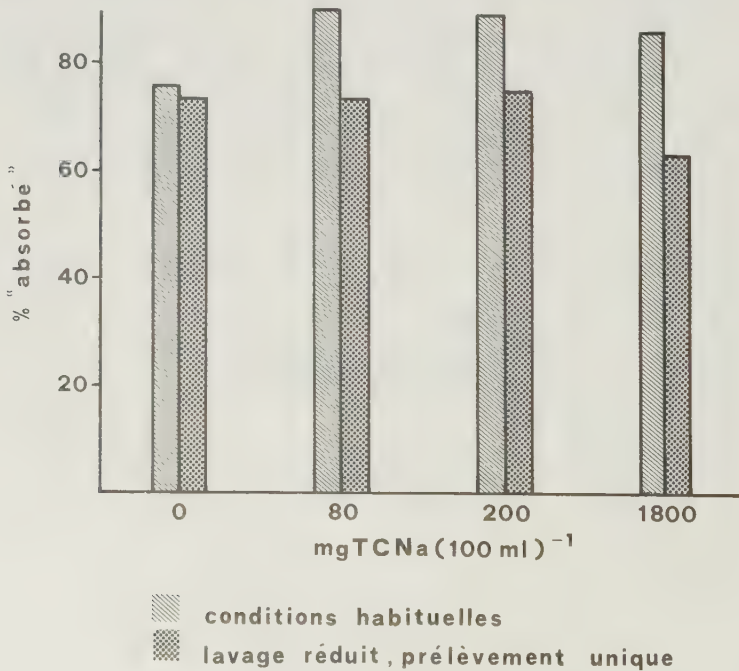
Influence du TCNa sur les taux sanguins du salicylamide



Plusieurs auteurs^{139,141,142} attribuent l'augmentation du transfert des substances médicamenteuses en présence de tensio-actifs à l'effet de ces derniers sur la perméabilité de la membrane intestinale. Dans cette hypothèse, il nous semble utile de savoir si des conditions expérimentales ménageant davantage l'intégrité de l'épithélium et le mucus qui le recouvre modifient l'action du TCNa sur le transport. Pour cette raison, nous répétons certaines expériences en réduisant le débit (5 ml/min) et le volume (150 ml) de la solution de lavage, ainsi qu'en se limitant à un seul prélèvement après 30 minutes (fig.24).

Figure 24

Influence des conditions expérimentales sur l'absorption de l'acide salicylique (200 mg/100 ml), estimée par mesure de la concentration dans le lumen intestinal après 30 minutes



Les résultats de ces nouvelles¹ investigations permettent de formuler quelques remarques ou hypothèses.

En absence de sel biliaire, le taux de disparition de l'acide salicylique est le même, quel que soit le procédé de lavage. On ne peut donc impliquer le rôle des différences de pression hydrostatique à l'intérieur du lumen intestinal dans les deux situations, pourtant souvent incriminé dans ce type d'étude. Par contre, l'effet du TCNa est nettement plus marqué dans les conditions où la paroi intestinale est en contact avec un liquide fréquemment déplacé par le mouvement des pistons, surtout aux concentrations voisines ou inférieures à la C.M.C. Au-delà de cette dernière, l'action du tensio-actif au niveau de la perméabilité membranaire est contrebalancée par la formation des micelles, qui diminuent la fraction d'acide disponible pour l'absorption. Ces observations corroborent celles d'autres chercheurs^{28,135,136,161}

IV.3 Distribution des substances marquées dans différentes parties du système digestif

Puisque l'on admet qu'un des rôles du tensio-actif est la modification de la perméabilité de l'épithélium intestinal, il est intéressant de connaître la répartition du TCNa et des principes actifs dans la paroi du tube digestif, dans le foie, le cholédoque et le sang. On peut également établir un bilan approximatif des quantités retrouvées dans ces tissus, en tenant compte de ce qui reste dans le lumen à la fin de l'expérience.

Les essais sont réalisés de la même manière que précédemment, mais avec une solution dépourvue d'inuline; les deux rinçages préalables avec les 3,5 ml de la solution à tester sont supprimés. Pendant la durée de l'expérience (60 min), aucun prélèvement n'est effectué. A la fin, la solution restante est chassée avec la pompe et son volume est mesuré avant le dosage. Puis on lave 5 fois l'intestin avec 2,5 ml de tampon de *Sørensen*. Chaque eau de lavage est récoltée et dosée séparément après mesure de son volume. Enfin, on pratique une ponction cardiaque pour obtenir un échantillon de sang.

L'intestin grêle est prélevé et séparé en trois sections correspondant au duodénum, au jéjunum et à l'iléon. Chacune est pesée et séchée sous vide sur du pentoxyde de phosphore jusqu'à poids constant. On procède de même avec le foie et le cholédoque. Les dosages sont effectués, après homogénéisation et broyage des tissus, par combustion dans un appareil Benox^R. Le $^{14}\text{CO}_2$ ainsi recueilli est solubilisé dans 10 ml d'éthanolamine puis compté dans un compteur TRI/CARB 3000 Packard. Le bilan des quantités ainsi retrouvées est regroupé dans les tableaux 19 et 20.

Tableau 19

Répartition du TCNa en présence d'acide salicylique (200 mg/100 ml); pourcentage de la quantité administrée dans l'intestin, après 60 min

Concentration TCNa [S]/mg (100 ml) ⁻¹	Conditions	Contenu intestinal + liquides de lavage	Sang	Duodénum	Jéjunum	Iléon	Foie	Cholédoque	Total
200	Cholédoque non ligaturé	33,80	0	0,44	1,31	0,73	0,78	0,02	37,08
200	Cholédoque ligaturé	35,48	4,97	0,82	3,93	1,32	12,26	0,06	58,84
1800	Cholédoque non ligaturé	77,71	0,24	0,30	2,35	1,33	0,84	0	82,77
1800	Cholédoque ligaturé	75,16	3,83	0,50	3,94	1,95	6,91	0,03	92,32

La ligature du canal cholédoque entraîne une accumulation hépatique du sel biliaire; dans ces conditions, on retrouve également ce dernier en quantités appréciables dans le sang, alors qu'il n'en contient pratiquement pas si la bile, sans ligature du canal, peut se déverser dans le duodénum, en amont de la canule fixée sur ce segment. Pour la forte concentration de taurocholate, le pourcentage retrouvé dans le liquide intestinal et les eaux de lavage est plus du double de celui correspondant à la concentration sub-micellaire. Ceci signifierait qu'au-dessus de la C.M.C., une forte proportion de TCNa à l'état micellaire n'est pas absorbé et demeure dans le lumen. De même, le bilan montre qu'à forte concentration, la presque totalité est retrouvée dans les milieux examinés. Au contraire, avec 200 mg/100 ml de TCNa, le bilan représente un déficit de plus de 40%, dû probablement à une élimination rapide par les voies urinaires ou au métabolisme du sel biliaire.

D'autre part, ces combustions ne révèlent qu'une rétention faible du TCNa dans la paroi intestinale. Il est toutefois à remarquer qu'elle est plus forte pour la concentration de 1800 mg/100 ml. La ligature du cholédoque, bloquant la circulation du sel biliaire, atténue cette différence en favorisant son accumulation dans les différents organes examinés.

Nous procédons aussi à des combustions dans le but de connaître la répartition des deux principes actifs (tabl. 20).

Tableau 20

Répartition des deux dérivés dans les organes; pourcentage de la quantité administrée dans l'intestin, après 60 min

Concentration TCNa [S]/mg (100 ml) ⁻¹	Conditions	Contenu intestinal + liquides de lavage	Sang	Duodénum	Jéjunum	Iléon	Foie	Choléoque	Total
A C I D E S A L I C Y L I Q U E (200 mg/100 ml)									
—	Choléoque ligaturé	2,29	15,23	0,14	0,70	0,65	4,38	0,03	23,42
200	Choléoque non ligaturé	1,86	16,55	0,16	0,64	0,66	3,48	0,04	23,40
1800	Choléoque non ligaturé	24,09	11,19	0,16	1,01	1,22	3,39	0,02	41,08
S A L I C Y L A M I D E (200 mg/100 ml)									
—	Choléoque ligaturé	7,87	13,32	0,28	1,11	1,15	7,32	0,04	31,10
200	Choléoque ligaturé	3,89	13,02	0,16	0,77	0,68	3,24	0,02	21,78
1800	Choléoque ligaturé	23,20	16,36	0,28	1,55	1,30	4,72	0,03	47,44

Ces combustions permettent de constater une certaine similitude entre le devenir des principes actifs et celui du sel biliaire. En effet, pour les deux dérivés, la quantité présente dans la paroi intestinale, est relativement faible; cependant, la rétention est plus importante lorsque le TCNa est à l'état micellaire. De plus, avec les deux dérivés et comme dans le cas des combustions avec le TCNa marqué, on retrouve une plus grande proportion de médicament dans le contenu du lumen et les eaux de lavage en présence des micelles. Nous pouvons donc bien conclure qu'il y a effectivement emprisonnement des substances médicamenteuses dans la phase micellaire, puisque aussi bien les deux principes actifs que le TCNa (1800 mg/100 ml) se retrouvent en proportions plus importantes qu'en présence des seuls monomères.

IV.4 Conclusions de l'étude *in situ*

Les différentes expériences *in situ* effectuées chez le rat permettent de mettre en évidence une action du TCNa sur l'absorption des deux dérivés examinés. L'effet du sel biliaire sur la membrane digestive et sur l'absorption des principes actifs résulte de deux mécanismes différents. D'une part, le tensio-actif agit sur la perméabilité de la paroi^{162,163} et d'autre part, il provoque l'emprisonnement d'une partie de la substance active dans la phase micellaire et diminue ainsi la quantité disponible pour l'absorption. Cette seconde action n'existe que lorsque le tensio-actif est à l'état micellaire,

donc à des concentrations assez élevées. Ce double mécanisme a pu être mis en évidence par la modification des mouvements de la solution, diminuant l'action du tensio-actif au niveau de la paroi intestinale. La combinaison de ces contributions et leur importance réciproque conduit à l'effet final. Ainsi, pour de faibles concentrations de tensio-actif, l'action sur la perméabilité est prépondérante : il en résulte une augmentation de la disparition du principe actif du lumen intestinal. Au-delà de la C.M.C., les micelles de TCNa retiennent une partie du médicament; l'absorption intestinale apparente n'est alors que peu augmentée ou non modifiée.

Cette influence de la concentration du tensio-actif, pré-micellaire ou micellaire, a également été observée par *Malik, Gouda et Canaham*¹³⁵ pour l'absorption de la phénolphtaléine.

La modification de la perméabilité de la membrane est souvent attribuée à une déplétion en calcium. Certains travaux ont mis en évidence l'interaction des sels biliaires avec ce cation, en utilisant l'acide de l'éthylène-diamine-tétracétique. Toutefois cet effet n'est pas seul en cause : *Kakemi et coll.*¹³⁹ attribuent également cette altération de la perméabilité à un changement de l'organisation micellaire des phospholipides de la membrane¹⁶⁴.

La diminution de la quantité de principe actif libre a pour effet un ralentissement de l'absorption, comme cela fut

relevé avec l'acide salicylique en présence de polysorbate^{102,142}.

Nos constatations sont en accord avec certaines observations de *Gouda, Malik et Khalil*¹³⁶ concernant l'influence du sulfosuccinate de sodium sur l'absorption du pentobarbital.

V. Conclusions générales et résumé

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une interaction entre un tensio-actif physiologique, le taurocholate de sodium, et deux traceurs, le salicylamide et l'acide salicylique; nous avons également examiné son incidence sur les processus de transport.

Dans un premier temps, des essais *in vitro* ont permis d'étudier le phénomène de solubilisation micellaire en fonction de divers facteurs : degré d'ionisation de la substance médicamenteuse, nature, pH et température du milieu, concentration de sel biliaire.

Nous avons eu recours à trois méthodes différentes : méthode de la solubilité, dialyse à l'équilibre et dialyse dynamique. Chacune d'elles présente des avantages et offre des renseignements complémentaires. La première permet d'observer le comportement de solutions saturées en principes actifs, alors que les autres se réfèrent à des solutions de concentrations variables.

Les diverses interprétations appliquées aux trois méthodes, montrent qu'il existe une bonne corrélation entre elles. Elles conduisent à la notion de liaison à capacité infinie, correspondant à un partage du principe actif entre les deux phases présentes au-dessus de la C.M.C., à savoir phase micellaire et phase aqueuse.

L'importance de cette répartition est illustrée par un coefficient de partage apparent, indiquant la proportion de substance dans les micelles et celle dans le milieu dispersant. Sa valeur est influencée par la concentration en principe actif; elle diminue lorsque l'on approche de la saturation.

L'élévation de la température du milieu, à saturation, provoque un abaissement du coefficient de partage, ce qui permet de conclure à un phénomène exothermique.

Le rôle de la nature du milieu et du pH a fait l'objet d'essais avec le salicylamide. La présence d'électrolytes, qui abaissent la C.M.C. du tensio-actif, affaiblit la capacité de liaison du taurocholate de sodium.

L'augmentation de la concentration en sel biliaire, en accroissant la phase micellaire, intensifie le phénomène de solubilisation. La vitesse de transport de la fraction libre du traceur à travers des membranes artificielles en est alors diminuée.

Dans une seconde partie, nous avons examiné l'effet du taurocholate de sodium sur le transport des deux traceurs à travers la membrane intestinale de l'animal. Le rat a été choisi pour ces expériences, effectuées *in situ*.

La présence du tensio-actif entraîne une accélération du passage des deux dérivés salicylés. Cet accroissement est surtout sensible au-dessous de la C.M.C. Ceci s'explique par le double mécanisme de ce type d'adjuvant : d'une part, il agit en modifiant la perméabilité de la membrane; d'autre part, au-delà de la C.M.C., l'existence de deux phases et le partage du principe actif qui en résulte, conduisent à une diminution de la fraction libre. Ce second effet peut ainsi contrebalancer le premier.

L'analyse des différentes parties du tube digestif, révèle que la rétention du taurocholate de sodium ou du principe actif, bien que faible, est cependant plus marquée en présence de solution micellaire.

Cette dernière constatation constituerait une hypothèse du mode d'action des micelles sur le transport de substances faiblement absorbées.

* * * * *

BIBLIOGRAPHIE

1. *Gibaldi M.*, et *Feldman S.*, J. Pharm. Sci. 59, 579 (1970).
2. *Collet J.H.* et *Withington R.*, J. Pharm. Pharmacol. 24, 211 (1972).
3. *Allawala N.A.* et *Riegelman S.*, J. Am. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 42, 267 (1953).
4. *Shinoda K.* et *Nakagawa Tamamushi*, Colloid surfactants, Academic Press, New York and London, 1963.
5. *Oppenheim R.C.*, Austr. J. Pharm. Sci. NS 5, 11 (1976).
6. *Becher P.*, Micelle formation in aqueous and non aqueous solution, In: Non ionic surfactants, Schick M.J., vol. 1, Marcel Dekker, New York, 1967.
7. *Carless J.E.*, *Challis R.A.* et *Mulley B.A.*, J. Colloid Sci. 19, 201 (1964).
8. *Mulley B.A.*, Solubility in systems containing surface active agents, In: Advances in pharmaceutical sciences I, Academic Press, New York and London, 1964.
9. *Loh L.H.*, *Choulis N.H.* et *Rhodes C.T.*, Can. J. Pharm. Sci., 8, 93 (1973).
10. *Padmanabhan P. Nair* et *Kritchevsky D.*, Chemistry of bile acids, In: The bile acids, vol. 1, Plenum Press, New York-London, 1971.
11. *Small D.M.*, The physical chemistry of cholanic acids, In: The bile acids, vol. 1, Plenum Press, New York-London, 1971.
12. *Kellaway I.W.* et *Mariott C.*, Can. J. Pharm. Sci. 12, 70 (1971).

13. Ikeda K., Kato K. et Tukamoto T., Chem. Pharm. Bull. 19, 2510 (1971).
14. Bates T., Gibaldi M. et Kanig J.L., J. Pharm. Sci. 55, 191 (1966).
15. Garrett E.R., J. Pharm. Pharmacol. 18, 589 (1966).
16. Brown K.F. et Crooks M.J., Pharm. Acta Helv. 48, 494 (1973).
17. Kazmi S.J.A. et Mitchell A.G., J. Pharm. Pharmacol. 23, 482 (1971).
18. Crooks M.J. et Brown K.F., J. Pharm. Pharmacol. 26, 235 (1974).
19. Scatchard G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949).
20. Levy G.L., Miller K.E. et Reuning R.H., J. Pharm. Sci. 55, 394 (1966).
21. Alhaique F., Giacchetti D., Marchetti M. et Ricciari F.M., J. Pharm. Pharmacol. 29, 401 (1977).
22. Matsumoto H., Matsumura H. et Iguchi S., Chem. Pharm. Bull. 14, 391 (1966).
23. Patel N.K. et Kostenbauder H.B., J. Pharm. Sci. 47, 289 (1958).
24. Bahal C.K. et Kostenbauder H.B., J. Pharm. Sci. 53, 1027 (1964).
25. Bottari F., DiColo G., Nannipieri E., Saettone M.F. et Sefarini M.F., J. Pharm. Sci. 64, 946 (1975).
26. Pisano F.D. et Kostenbauder H.B., J. Am. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 48, 310 (1959).
27. Bradshaw J.W. et Rhodes C.T., J. Pharm. Sci. 61, 1163 (1972).
28. Yamada H. et Mamamoto R., Chem. Pharm. Bull. 13, 1279 (1965).
29. Deluca P.P. et Kostenbauder H.B., J. Am. Pharm. Assoc. (Sci.Ed.) 49, 430 (1960).
30. Park J.Y. et Rippie E.G., J. Pharm. Sci. 66, 858 (1977).

31. *Nguyen Phuong D. et Paiement J.*, Can. J. Pharm. Sci. 8, 130 (1973).
32. *Rippie E.G., Lamb D.J. et Romig P.W.*, J. Pharm. Sci. 53, 1346 (1964).
33. *Ismail A.A., Gouda M.W. et Motawi M.M.*, J. Pharm. Sci. 59, 220 (1970).
34. *Collet J.H. et Koo L.*, J. Pharm. Sci. 64, 1253 (1975).
35. *Collet J.H. et Koo L.*, Acta Pharm. Suec. 12, 81 (1975).
36. *Collet J.H. et Withington R.*, J. Pharm. Pharmacol. 25, 974 (1973).
37. *Withington R. et Collet J.H.*, J. Pharm. Pharmacol. 25, 273 (1973).
38. *Lovering F.G. et Black D.B.*, J. Pharm. Sci. 62, 602 (1973).
39. *Bloor J.R. et Morrison J.C.*, J. Pharm. Pharmacol. 24, 927 (1972).
40. *Lovering E.G., Black D.B. et Rowe M.L.*, J. Pharm. Sci. 63, 1224 (1974).
41. *Naggar V.F., Moustafa M.A., Khalil S.A. et Motawi M.M.*, Can. J. Pharm. Sci. 7, 112 (1972).
42. *Barry B.W. et El Eini D.I.D.*, J. Pharm. Pharmacol. 28, 219 (1976).
43. *Humphrey K.J. et Rhodes C.T.*, J. Pharm. Sci. 57, 79 (1968).
44. *Mitchell A.G. et Brown K.F.*, J. Pharm. Pharmacol. 18, 115 (1966).
45. *Crook M.J. et Brown K.F.*, J. Pharm. Pharmacol. 25, 281 (1973).
46. *Kazmi S.J.A. et Mitchell A.G.*, J. Pharm. Sci. 62, 1299 (1973).
47. *Patel N.K.*, Can. J. Pharm. Sci. 2, 97 (1967).
48. *Patel N.K. et Foss N.E.*, J. Pharm. Sci. 54, 1497 (1965).

49. *Kazmi J.J.A. et Mitchell A.G.*, Can. J. Pharm. Sci. 11, 10 (1976).
50. *Patel N.K. et Foss N.E.*, J. Pharm. Sci. 53, 94 (1964).
51. *Kakemi K., Arita T., Muranishi S.*, Chem. Pharm. Bull. 13, 976 (1965).
52. *Crook M.J. et Brown K.F.*, Austr. J. Pharm. Sci. 3, 93 (1974).
53. *Nakano M.*, J. Pharm. Sci. 60, 571 (1971).
54. *Cardinal J.R., Chang Y. et Ivanson D.D.*, J. Pharm. Sci. 67, 854 (1978).
55. *Alhaique F., Marchetti M., Ricciari F.M. et Santucci E.*, Farmaco (Ed.Sci.) 27, 145 (1972).
56. *Poelman M.C., Puisieux F. et Chaumeil J.C.*, Ann. Pharm. Franç. 33, 551 (1975).
57. *Bates T.R., Gibaldi M. et Kaning J.C.*, J. Pharm. Sci. 55, 901 (1966).
58. *McBain J.W. et Hutchinson E.*, Solubilization, Academic Press Inc., New York N.Y., 1955.
59. *Biber M.L. et Rhodes C.T.*, Acta Pharm. Suec. 11, 275 (1974).
60. *Mitchell A.G. et Braadhead J.F.*, J. Pharm. Sci. 56, 1261 (1967).
61. *Delaloye P.*, thèse Université de Lausanne, (1974).
62. *Mukerjee P. et Cardinal J.R.*, J. Pharm. Sci. 65, 882 (1976).
63. *Klotz I.M., Walker F.M. et Pivan R.B.*, J. Am. Chem. Soc. 68, 1486 (1946).
64. *Keipert S. et Voigt R.*, Pharmazie 30, 589 (1975).
65. *Keipert S., Korner I. et Voigt R.*, Pharmazie 31, 790 (1976).
66. *Keipert S., Schultze H.-H. et Voigt R.*, Pharmazie 32, 339 (1977).
67. *Keipert S., Becker J. et Voigt R.*, Pharmazie 32, 228 (1977).
68. *Keipert S., Voigt R. et Becker J.*, Pharmazie 32, 280 (1977).

69. *Buri P. et Crevoisier C.*, Bulletin technique No 68, Ets Gattefossé, 1973/74, "Emploi et intérêt des membranes dans la recherche pharmaceutique".
70. *Cho M.J., Mitchell A.G. et Pernarowski M.*, J. Pharm. Sci. 60, 196 (1971).
71. *Cho M.J., Mitchell A.G. et Pernarowski M.*, J. Pharm. Sci. 60, 721 (1971).
72. *Patel N.K. et Romanowski J.M.*, J. Pharm. Sci. 59, 372 (1970).
73. *Short P.M., Abbs E.T. et Rhodes C.T.*, J. Pharm. Sci. 59, 995 (1970).
74. *Hayton W.L., Guttman D.E. et Levy G.*, J. Pharm. Sci. 61, 356 (1972).
75. Instructions de l'appareil Dianorm^R.
76. *Schildknecht J. et Weder H.G.*, Institut für Molekularbiologie und Biophysik, ETH, Zürich, 1974.
77. *Weder H.G., Schildknecht J. et Kesselring P.*, Amer. Lab. 10, 15 (1971).
78. *Lutz R.A., Wiegand V.W. et Weder H.G.*, Protein-Ligand interactions, H. Sund and G. Blauer Editeurs, 1975, p. 385.
79. *Lutz R.A., Lutz-Ewan L. et Weder H.G.*, Steroids, march 1973, p. 423.
80. *Crevoisier C.*, thèse No 1676, Université de Genève, (1974).
81. *Garrett E.R. et Chemburkar P.B.*, J. Pharm. Sci. 57, 944 (1968).
82. *Flynn G.L. et Smith E.W.*, J. Pharm. Sci. 60, 1713 (1971).
83. *Poelman M.C., Puisieux F. et Chaumeil J.C.*, Ann. Pharm. Franç. 33, 693 (1975).
84. *Agreen A. et Elfosson R.*, Acta Pharm. Suec. 4, 281 (1967).
85. *Meyer M.C. et Guttman D.E.*, J. Pharm. Sci. 57, 1627 (1968).
86. *Pedersen P.V., Crook M.J. et Brown K.F.*, J. Pharm. Sci. 66, 1458 (1977).

87. Meyer M.C. et Guttman D.E., J. Pharm. Sci. 57, 895 (1968).
88. Meyer M.C. et Guttman D.E., J. Pharm. Sci. 59, 33 (1970).
89. Meyer M.C. et Guttman D.E., J. Pharm. Sci. 59, 39 (1970).
90. Bottari F., Boll. Chim. Farm. 115, 113 (1978).
91. Sautter A., Doelker E., Buri P. et Mordier D., J. Pharm. Belg. 32, 229 (1977).
92. Doelker E. et Buri P., Pharm. Acta Helv. 47, 495 (1972).
93. Gerstmeyer A., Zentralbl. Pharm. 111, 821 (1972).
94. Agreen A., Pharm. Acta Helv. 47, 495 (1972).
95. Draper N. et Smith H., Applied regression analysis, John Wiley & Sons, Inc., New York-London, 1966, p. 178.
96. Plumbridge T.W., Aarous L.J. et Brown J.R., J. Pharm. Pharmacol. 30, 69 (1978).
97. Donbrow M., Azoz E. et Ham R., J. Pharm. Sci. 59, 1427 (1970).
98. Martis L., Hall N.A. et Takkar A.L., J. Pharm. Sci. 61, 1757 (1972).
99. Merrill R.C. et McBain J.W., Ind. Eng. Chem. 34, 915 (1942).
100. Hofmann A.F., Biochem. J. 89, 57 (1963).
101. Mankowich A.M., J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 185 (1965).
102. Collet J.H., Withington R. et Cox B., J. Pharm. Pharmacol. 26, 34 (1974).
103. Pflieger K., Methods for the investigation of absorption in animals, in: Pharmacology of intestinal absorption, Ed. W. Forth and W. Rummel, Pergamon Press, Oxford, 1975.
104. Perrier D. et Gibaldi M., J. Pharm. Sci. 62, 1486 (1973).
105. Meshali M.M. et Attia I.E., Can. J. Pharm. Sci. 13, 42 (1978).
106. Feldman S., Salvino M. et Gibaldi M., J. Pharm. Sci. 59, 705 (1970).
107. Feldman S., Richardson J., Freeman C., Pollock S., Berger J. Kaplan K. et Rhoa G., J. Pharm. Sci. 63, 454 (1974).

108. *Crevoisier C., Buri P. et Boucherat J.*, *Pharm. Acta Helv.* 50, 231 (1975).
109. *Chowhan Z.T. et Amaro A.A.*, *J. Pharm. Sci.* 65, 1249 (1977).
110. *Blanchard J. et Straussner A.*, *Acta Pharm. Suec.* 14, 279 (1977).
111. *Benet L.Z., Orr J.M., Turner R.H. et Webb H.S.*, *J. Pharm. Sci.* 60, 234 (1971).
112. *Feldman S. et Reinhard M.*, *J. Pharm. Sci.* 65, 1460 (1976).
113. *Pfeffer M. et Schor J.M.*, *J. Pharm. Sci.* 61, 1223 (1972).
114. *Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T. et Swintosky J.V.*, *J. Pharm. Sci.* 58, 1196 (1969).
115. *Barry H.T., Zeitz W. et Coldwell B.B.*, *J. Pharm. Sci.* 63, 1367 (1974).
116. *Benakis A., Sugnaux F. et Vitus J.*, Fourth European Workshop on drug metabolism, University of Mainz, 1974.
117. *Ayres J.W., Duangchit Lorskulsint, Lock A.*, *J. Pharm. Sci.* 64, 1958 (1975).
118. *Ayres J.W., Duangchit Lorskulsint, Lock A., Kuhl L. Laskar P.A.*, *J. Pharm. Sci.* 65, 832 (1976).
119. *Pelzmann K.S. et Havemeyer R.N.*, *J. Pharm. Sci.* 62, 1609 (1973).
120. *Philips W.A., Stafford W.W. et Stuut J.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 733 (1973).
121. *Kobayashi H., Nishimura T., Okumura K., Muranishi S. et Sezaki H.*, *J. Pharm. Sci.* 63, 580 (1974).
122. *Levy G. et Anello J.A.*, *J. Pharm. Sci.* 57, 101 (1968).
123. *Anello J.A. et Levy A.*, *J. Pharm. Sci.* 58, 721 (1969).
124. *Gouda M.W.*, *Can. J. Pharm. Sci.* 9 37 (1974).
125. *Kakemi K., Arita T. et Muranishi S.*, *Chem. Pharm. Bull.* 13, 861 (1965).
126. *Kakemi K., Arita T. et Muranishi S.*, *Chem. Pharm. Bull.* 13, 976 (1965).

127. Gouda M.W., Khalafallah N. et Khalil S.A., J. Pharm. Sci. 66, 727 (1977).
128. Khalafallah N., Gouda M.W. et Khalil S.A., J. Pharm. Sci. 64, 991 (1975).
129. Levy G. et Perala A., J. Pharm. Sci. 59, 874 (1970).
130. Hikal A.H., Dyer L. et Wong S.W., J. Pharm. Sci. 65, 621 (1976).
131. Bloedow D.C. et Hayton W.L., J. Pharm. Sci. 65, 328 (1976).
132. Utsumi I., Khono K. et Takeuchi Y., J. Pharm. Sci. 63, 676 (1974).
133. Florence A.T. et Gillan J.M.N., J. Pharm. Pharmacol. 27, 152 (1975).
134. Reddy R.K., Khalil S.A. et Gouda M.W., J. Pharm. Sci. 65, 115 (1976).
135. Malik S.N., Canaham D.H. et Gouda M.W., J. Pharm. Sci. 64, 987 (1975).
136. Gouda M.W., Malik S.N. et Khalil S.A., Can. J. Pharm. Sci. 10, 20 (1975).
137. Crevoisier C., Buri P. et Bouchérat J., Pharm. Acta Helv. 50, 231 (1975).
138. Nightingale C.H., Wynn R.J. et Gibaldi M., J. Pharm. Sci. 58, 1005 (1969).
139. Kakemi K., Sezaki H., Konishi R., Kimura T. et Okita A., Chem. Pharm. Bull. 18, 1034 (1970).
140. Gaginella T.S., Perrin J.H., Vallner J.J. et Bass P., J. Pharm. Sci. 63, 790 (1974).
141. Kakemi K., Sezaki H., Konishi R., Kimura T. et Murakami M., Chem. Pharm. Bull. 18, 275 (1970).
142. Gaginella T.S., Bass P., Perrin J.H. et Vallner J.J., J. Pharm. Sci. 62, 1121 (1973).
143. Nightingale C.H., Axelsson J.E. et Gibaldi M., J. Pharm. Sci. 60, 145 (1971).
144. Marriott C. et Kellaway I.W., J. Pharm. Pharmacol. 28, 620 (1976).

145. Pelzmann K.S., J. Pharm. Sci. 62, 1609 (1973).
146. Gibaldi M. et Grundhofer B., Can. J. Pharm. Sci. 9, 8 (1974).
147. Hayton W.L. et Levy G., J. Pharm. Sci. 61, 362 (1972).
148. Hayton W.L., Levy G. et Regardh C.G., J. Pharm. Sci. 61, 473 (1972).
149. Hayton W.L. et Levy G., J. Pharm. Sci. 61, 367 (1972).
150. Julkunen R.J.K., J. Pharm. Pharmacol. 28, 493 (1976).
151. Koysooko R. et Levy L., J. Pharm. Sci. 63, 829 (1974).
152. Mewhali M.M. et Nightingale C.H., J. Pharm. Sci. 65, 344 (1976).
153. Philips W.A., Schultz J.R. et Stafford W.W., J. Pharm. Sci. 63, 1097 (1974).
154. Doluisio J.T., Tan G.H., Billups N.F. et Diamond L., J. Pharm. Sci. 58, 1200 (1969).
155. Soergel K.H., Gastroenterology 54, 449 (1968).
156. Neary M.P., Nuclear laboratory experiment manual, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California.
157. Rapkin E., Introduction to liquid scintillation counting, Intertechnique, 78 - Plaisir-Yvelines, France.
158. Schedl H.P. et Clifton J.A., Gastroenterology 41, 491 (1961).
159. Schanker L.S., Tocco D.J., Brodie B.B. et Hogben C.A., J. Pharm. Exp. Ther. 123, 81 (1958).
160. Schanker L.S., Shore P.A., Brodie B.B. et Hogben C.A., J. Pharm. Exp. Ther. 120, 528 (1957).
161. Collet J.H., Koo L. et Cox B., Acta Pharm. Suec. 15, 119 (1978).
162. Feldman S. et Gibaldi M., J. Pharm. Sci. 58, 425 (1969).
163. Feldman S. et Gibaldi M., J. Pharm. Sci. 58, 967 (1969).
164. Feldman S., Reinhard R. et Willson C., J. Pharm. Sci. 62, 1961 (1973).

